Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen

Von B. v. Cholnoky, Enkhuizen, und K. Höfler, Wien
(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 23 Textabbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung am 27. April 1950)

Der Winter 1944/45 führte uns für einige Monate zu gemeinsamer Arbeit in Wien zusammen.

Wir wählten Vitalfärbungsstudien an Algen zum Gegenstand. Doch war diesmal nicht eindringende Analyse des Zellgeschehens am Einzelobjekt das Ziel, wie dies wohl sonst der Arbeitsweise beider Autoren entsprochen hätte, sondern es schien im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten ersprießlicher, eine vergleichend-zytologische Studie an zahlreichen Algen zu unternehmen. Es stand uns gutes Hochmoormaterial zur Verfügung, das im vorangegangenen Herbst frisch eingebracht und seither mit Sorgfalt kultiviert worden war. Dieses wählten wir für unsere Versuche; es enthielt mehrere vordem nie für zellphysiologische Studien herangezogene Arten und in jedem Tropfen fanden sich zahlreiche, verschiedenen systematischen Gruppen angehörige Algen beisammen.

Es galt also einerseits, das relative Farbspeichervermögen der Arten zu vergleichen, anderseits, die qualitativ verschiedene Weise der Vitalfärbung bei den verglichenen Algen kennenzulernen. — Ein verschiedenes Färbeverhalten kann nicht durch ungleiche Milieufaktoren verursacht sein, wenn die untersuchten Algen einer natürlichen, ausgeglichenen Biozönose angehören, die sich bei der Kultur ohne wesentliche Störung erhalten hat. Die im Versuche gefundenen Differenzen werden vielmehr in erster Linie durch unterscheidende Art- oder Familienmerkmale der Algen, nur in zweiter Linie vielleicht auch durch Alter und Entwicklungszustand des Materials, also durch innere Faktoren, bestimmt sein; doch

läßt sich erwarten, daß Einflüsse der letzteren Art am erwachsenen Material, das zur Zeit des herbstlichen Maximalaspektes der Algenvegetation gesammelt ist, zurücktreten werden.

I. Material und Methodik.

Der Hauptteil der zur Vitalfärbung verwendeten Algenproben wurde am 15. Oktober 1944 im Fichtelgebirge gesammelt und am 17. Oktober nach Wien eingebracht. Weiteres Desmidiaceenmaterial war am 13. September 1944 im Ibmer Moor in Oberösterreich gesammelt und frisch nach Wien gebracht worden.

Der Fundort im Fichtelgebirge war ein kleines Hochmoor oberhalb des Stausees beim Jagdhaus Karches, das bei etwa 800 m Seehöhe im Sattel zwischen zwei Hochgipfeln des Gebirges, dem Ochsenkopf und dem Haberstein, gelegen ist. Der Präsident der Bayreuther Naturwissenschaftlichen Gesellschaft, Herr Hauptlehrer Karl Kronberger, hatte einen von uns auf einer Autotagestour in das damals schwer zugängliche interessante Gebiet geführt. Die gesammelten Proben wurden, vor Erwärmung geschützt, nach Wien gebracht, am 21. Oktober durchgesehen und die sechs besten in Standortwasser zunächst auf einer lichten offenen Veranda, nach Frosteinbruch zwischen Westfenstern licht und kühl kultiviert. Die Materialien Karches 1 und 2 verblieben in den etwa einen halben Liter fassenden Standgläsern, worin sie gesammelt waren, in einem Überfluß von Originalwasser. Die Proben 3 bis 6 blieben in ihren Stoppelfläschchen. Nur Probe 1 fror um die Weihnachtszeit fest ein, die anderen Proben wurden in Frostnächten in ein ungeheiztes Zimmer gebracht, bei Tage ins lichte Fenster gestellt und hielten bis zum Frühling in gutem Zustand.

Wir arbeiteten am meisten mit dem Material Karches 2, welches, aus einer tiefen Moorblänke gesammelt, grüne, dichte, schwammige Algenwatten vom Auftrieb enthielt, die einige Wochen lang im Glase schwammen und sich dann zu Boden senkten. Die häufigsten Formen waren an Fadenalgen zwei Oedogoniumarten, *Microspora floccosa* s. l., *Gonatozygon monotaenium*, *Gymnozyga Brebissonii*, *Anabaena laxa* (det. Geitler), *Mougeotia* sp. und spärlichere *Bulbochaete setigera*, dazwischen fanden sich mäßig reichlich größere Desmidiaceen, worunter *Tetmemorus granulatus* dominierte, *Micrasterias sol*, *Euastrum affine* hervortraten, *Euastrum ansatum*, *Closterium* (= *Penium*) *libellula* var. *interrupta* (Roy et Bisset) West et G. S. West, *Cosmarium difficile*, *Staurastrum furcatum*, *St. polymorphum*, ferner *Euastrum binale*,

Euastrum denticulatum, Cosmarium, Regnesii und etliche andere kleinere Formen vereinzelt vorkamen. Unter den Chlorophyceen war weitaus am auffälligsten eine Protococcale, die nach freundlicher Mitteilung von Herrn Prof. L. Geitler dem seinerzeit von Steinecke aus dem Zehlaubruch beschriebenen *Coelastrum conglomeratum* entspricht; wie uns Herr Kollege Geitler schrieb, gehört die Alge allerdings wohl nicht in die Gattung Coelastrum, sondern sie sollte neu untersucht und umgetauft werden. Die traubenförmigen, dunkelgrünen Kolonien dieser Charakteralge des Karchesmoores treten schon bei schwacher Vergrößerung auffällig hervor. — Recht reichlich fand sich zwischen den anderen Algen stets die Heteroconte *Chlorobotrys regularis* (Bohlin) West, ferner mehrere kleinere Protococcales und Tetrasporales. — Von Diatomeen sind die gewöhnlichen Hochmoorformen vertreten, so z. B. *Pinnularia viridis* und *Frustulia rhomboides*. Die Kieselalgen spielen aber keine große Rolle.

Die Algenwatte Karches 5 war ähnlich zusammengesetzt, doch war die Probe, die eine tote Libellenlarve enthielt, wohl nährsalzreicher und die Fadenalgen freudiger grün. An der Zusammensetzung der Watte war *Microspora floccosa* neben *Gonatozygon monotaenium* reichlich beteiligt.

Im Fläschchen Karches 6 aus einer anderen Blänke erhielten sich die vom Auftrieb gesammelten Moorflocken wochenlang schwimmend. Fadenalgen traten hier zurück, kurzfädiges *Oedogonium Itzigsohnii* de Bary, das reichlich fruchtete, herrschte vor, *Chlorobotrys regularis* und *Coelastrum conglomeratum* bildeten die Hauptmasse der Kleinalgen. Mittlere und kleine Desmidiaceen fanden sich reichlicher, die übrigen früher genannten Arten traten großenteils wieder auf, wenn auch in anderem Mengenverhältnis.

In allen Proben waren als charakteristische Formen *Gonatozygon monotaenium, Euastrum affine, Micrasterias sol, Coelastrum conglomeratum, Chlorobotrys regularis, Oedogonium Itzigsohnii* (das sich nach der Monographie von Hirn eindeutig bestimmen ließ) und ein größeres (unbestimmtes, von uns vorläufig als „*Oed. parallelum*" ad interim bezeichnetes) Oedogonium vertreten.

Aus dem an großen Zieralgen reichen Ibmer Material wurden folgende Arten (nach West und Krieger) bestimmt und mehrfach zu Versuchen herangezogen: *Netrium digitus, Closterium (= = Penium) libellula, Cl. Dianae, Cl. moniliforme* var. *concavum* Klebs, *Cl. parvulum, Cl. striolatum, Cl. costatum* var. *Westii* Cushmann (vgl. Krieger, Tafel 34, Fig. 8), *Pleurotaenium truncatum, Euastrum oblongum, Micrasterias sol, M. rotata, M. truncata, M. crux melitensis, Cosmarium pyramidatum, C. tur-*

gidum, C. pachydermum, C. Brébissonii, C. Botrytis, C. conspersum, Staurastrum brevispinum Bréb., *St. Dickiei, St. polytrichum.* Von Diatomeen war die stattliche *Pinnularia dactylus* reichlich vertreten.

Das Material gehörte einer Sekundärbiozönose an und war auf einem von flacher Wasserschicht bedeckten, mit *Utricularia minor* locker bewachsenen alten Moorstich gesammelt.

Wir färbten mit Neutralrot, Neutralviolett, Methylenblau, Prune pure und gelegentlich mit Rhodamin 3 B, Safranin und dem Fluoreszenzfarbstoff Akridinorange.

In den meisten Versuchen wurde Neutralrot verwendet, welches nach Aussage von Guilliermond der unschädlichste basische Farbstoff ist und dank der günstigen Lage des Umschlagbereiches bei p_H 7 bis 8 permeierfähige Moleküle, bei p_H 5 vorwiegend dissoziierte, adsorbierbare Farbkationen enthält. Wir färbten meist mit mittelstarken (1 : 10.000 und 1 : 5000), zum Teil mit stärkeren (1 : 2500, 1 : 2000 eventuell 1 : 1000) Farblösungen, die in Wiener Leitungswasser (p_H um 7,8) und in manchen Reihen vergleichsweise in dest. H_2O (p_H 5—5,5) angesetzt worden waren. Phosphatpufferung wurde in den mitgeteilten Versuchen nicht angewandt. Die Farblösung wurde der auf dem Objektträger ausgebreiteten Algenprobe, von der das Standortwasser mit Filtrierpapier rasch abgesaugt war, in dicker Schicht aufgesetzt, nach der Färbezeit wurde mit Deckglas, welches in den Hauptversuchen gewöhnlich von Glassplittern gestützt war, bedeckt und Leitungswasser bzw. H_2O mehrfach gründlich mit Filtrierpapier durchgesaugt. Sodann wurde nach Entfernung der Deckglassplitter erst bei schwacher, darauf bei stärkerer Vergrößerung (Zeiß, Fluoritsystem E, 60 ×, oder Wasserimmersion mit Korrektionsfassung J′) beobachtet. Die nach der Färbung verflossene Zeit wurde regelmäßig notiert.

Bei einem Teil der Versuche wurde Kurzfärbung angewandt. So kam Material Karches 2 öfters für 5 Min. in Neutralrot 1 : 5000 in Leitungswasser, am 23. März für 2,5 oder 5 Min. in Neutralrot 1 : 2500 in Leitungswasser. Nach dem Durchsaugen reinen Wassers waren die Proben dann zunächst oft nur schwach und unklar rosa gefärbt. Erst nach längerem Verweilen in Wasser nahm die Vitalfärbung der Algenzellen stark zu. Dieses Verhalten ist zunächst auffällig, die Erklärung liegt aber einfach. Der meiste Farbstoff wird anfangs vom toten Pflanzendetritus gespeichert, im reinen Wasser gibt dann die aus Zellwänden usw. gebildete Masse den zum Hauptteil bloß adsorptiv gespeicherten Farbstoff an die jetzt dünne Flüssigkeitsschicht ab, aus der nun die lebenden Algen das Neutralrot anreichern. So ist für langsame Farbzufuhr gesorgt. Das relative Speichervermögen der einzelnen Arten der Gesellschaft wird erkennbar.

Auch ein dauerndes Verbleiben im Farbtropfen unter Deckglas wird von Algenmaterialien, welche mehr farbbindenden Detritus als lebende Zellen enthalten, naturgemäß gut vertragen, da ja die überschüssige Farbe alsbald festgelegt wird. Man kann in solchen Fällen auf das Durchsaugen von reinem Wasser verzichten.

Bei einer Gruppe von Versuchen wurde der Vorgang der Lebendfärbung selbst in seinem zeitlichen Verlauf verfolgt. Dabei war dieselbe Zelle vom Anfang, d. h. vom ersten Zutritt der Farblösung an, dauernd unter Beobachtung zu halten. Die Farblösung wird dabei unter dem Mikroskop behutsam einmal oder mehrmals mit Fließpapier durch das Präparat ge-

saugt, eventuell unter Verzicht auf die genaue Kenntnis der jeweils herrschenden Farbkonzentration.

Bei den Färbeversuchen mit anderen Farbstoffen war die Methodik im wesentlichen ähnlich. Die nötigen Einzeldaten werden bei den betreffenden Versuchen mitgeteilt.

Die Zeichnungen wurden auf Grund genauer mikrometrischer Messungen und unter Zuhilfenahme eines Rasters in Farben ausgeführt. Doch müssen wir uns im folgenden mit der Wiedergabe von Schwarzweißbildern begnügen.

II. Neutralrotfärbung.

Alle in diesem Abschnitt behandelten Algen waren den Materialien Karches 1, 2, 5 und 6 entnommen. Das Neutralrot war in Wiener Leitungswasser von leicht alkalischer Reaktion (p_H um 7,8) gelöst.

Die Algen aus derselben Biozönose zeigten, im selben Tropfen untersucht, oft eine ganz verschiedene Art der Farbspeicherung.

1. Fadenförmige Chlorophyceen.

Mit am stärksten speichern die Fäden von *Microspora* (Abb. 1) und von *Oedogonium* (Abb. 2—4), welche in mehreren Materialen die Grundmasse der Algenwatten bilden.

Bei *Microspora floccosa* (Vauch) Thuret s. l. erscheinen stets bald nach dem Zutritt des Farbstoffes kleine dunkelrote Körnchen, die sich von Beginn an in deutlicher B. M. B. befinden und schon dadurch ihre Lagerung im Zellsaft zu erkennen geben. In einem bestimmten Versuch waren Flocken des Materials, welche die Algen und Detritus enthielten, 12 Minuten mit Neutralrot 1 : 2500 in Leitungswasser behandelt und dann mit Leitungswasser ausgewaschen worden. 10 bis 14 Minuten nachher enthielten die Zellsäfte kleine Körnchen, nach 25 Minuten waren zahlreichere Körnchen entstanden, in einem bestimmten Faden waren es etwa 20 Stück pro Zelle. Nach 95 Minuten, als der Detritus völlig entfärbt und aller Farbstoff von den lebenden Zellen gespeichert war, waren die Kügelchen stark angewachsen; von diffuser Vakuolenfärbung war keine Spur. Vgl. Abb. 1.

In starkem Gegensatz dazu steht *Oedogonium Itzigsohnii* de Bary. Die Alge speichert rasch und stark, so daß die Fäden in den Mischproben bald stark rot hervorleuchten. Anfangs färbt sich die ganze Vakuole gleichmäßig und diffus rot, die Chloroplasten im Wandbelag sind dabei intakt und rein grün geblieben. Man sieht dann den plasmatischen Wandbelag etwas an Dicke zunehmen, alsbald tritt aber in der überwiegenden Mehrzahl der Zellen aller Fäden eine höchst charakteristische Änderung der Zell-

konfiguration ein. Die rosa Vakuolen verkleinern sich, es erfolgt eine typische Vakuolenkontraktion, wie sie seit Küster (1926) und Weber (1930) als Wirkung der Neutralrotfärbung an *Allium* bzw. *Elodea* bekanntgeworden und seither auch an vielen anderen Gewebszellen beobachtet worden ist. Wenn schwach gefärbt wurde, so ließ sich bei Dauerbeobachtung der Verlauf der Kontraktion gut verfolgen. Der Zellsaftraum verkleinert sich unter Ausbildung konkaver Konturen; der Tonoplast, der unter der Einwirkung der Farblösung während der Kontraktion mit verstärkten Konturen hervortritt, adhäriert noch stellenweise am Plasmawandbelag. Mit dem Fortschreiten der Kontraktion kommt es regelmäßig zu einer Teilung der Vakuole in mehrere Stücke. Diese nehmen allmählich eine unregelmäßige Konvexrundung und schließlich oft eine ziemlich genaue Kugelgestalt an. Im Endstadium, welches nach starker Färbung früher, nach schwacher später erreicht wird, liegen dann mehrere Teilvakuolen — oft sind es 4 bis 5 tiefrote Kugeln oder Ellipsoide — in der Achse jeder Zelle. Der Farbton verstärkt sich im Maße der räumlichen Einengung; in anderen Fällen nimmt er, wenn die Speicherung während der Verkleinerung andauert, noch in verstärktem Maße zu. Niemals erscheinen bei *Oedogonium Itzigsohnii* im Protoplasten außerhalb der Vakuolen rote Tröpfchen oder Körnchen. Auch rote Fällung im Zellsaft, wie sie für die *Microspora*-Fäden derselben Watten kennzeichnend ist, kommt niemals vor. Durchmustert man die *Oedogonium*-Fäden der Länge nach, so finden sich außer den Zellen, deren Vakuolenwandung sich kontrahiert hat, in jedem Faden einzelne Zellen, welche diffus rote, unkontrahierte Vakuolen erhalten haben. Die Beobachtung zeigt, daß diese Zellen sehr oft in Zwei- oder Dreizahl am Ende der Fäden oder in der Nachbarschaft toter Zellen gelegen sind. Daraus geht deutlich hervor, daß die Vakuolenkontraktion die normale Reaktion der Zellen auf den Impuls der alkalischen Neutralrotfärbung darstellt, während das Verharren der roten Vakuolen im Zustand der ursprünglichen Größe, d. h. das Ausbleiben der Kontraktion, eine Hemmungserscheinung ist. Während die von Küster bei Zwiebelzellen (der Schuppenaußenepidermis) beschriebene Spontankontraktion nach Neutralrotfärbung gerade in einzelnen, am Schnittrand der Präparate gelegenen Zellen zustande kommt, erfolgt unsere Vakuolenkontraktion bei *Oedogonium* umgekehrt in allen Zellen der Fäden mit Ausnahme der den Fadenenden benachbarten. Sie gleicht darin mehr der Allgemeinkontraktion bei vitalgefärbter *Elodea* und Zwiebel-Innenhäutchen (Weber 1930 a, Strugger 1936, Drawert 1940, Höfler 1948) als der Einzelkontraktion der Zellen der äußeren Zwiebelschuppen-Epidermis.



Abb. 1. *Microspora floccosa*, **Abb. 2, 3.** *Oedogonium Itzigsohnii*, **Abb. 4.** *Oedogonium* sp. Mit Neutralrot (p_H um 7,8) gefärbt; vgl. Text. — Entmischungskugeln bei *Microspora* mehr blaurot, kontrahierte Vakuolen bei *Oedogonium* erdbeerrot.

Von Interesse ist der Vergleich des Verhaltens der drei im Material vorhandenen Oedogonium-Arten. Das große *Oedogonium* mit nicht kapitälierten Zellen und 12—13 μ breiten Fäden (in unseren Protokollen als „*Oed. parallelum*“ ad interim bezeichnet) färbt sich sehr hübsch an, aber, zumal wenn der Farbstoff nicht im Überfluß geboten ist, doch deutlich schwächer als *Oedogonium Itzigsohnii*, und auch nach längerer Einwirkung bleiben gewöhnlich die meisten Vakuolen unkontrahiert; die ± kettenförmigen Chloroplasten erfahren oft eine an Systrophe gemahnende Ballung in den Zellen. Ein drittes, ganz kleines *Oedogonium* sp. kontrahiert so rasch und stark, daß die 2 bis 5 roten Teilvakuolen in den gestreckten Zellen noch etwas rascher als bei *Oed. Itzigsohnii* die Endform kleiner Kügelchen erlangen. Die physiologischen Unterschiede der Arten sind von Interesse. Der Vergleich der Reaktionsfreudigkeit nach Vitalfärbung wäre auf weitere Spezies auszudehnen, wobei die Untersuchung von Mischproben, d. h. von natürlicher Weise vergesellschafteten Algen, den Vorteil bietet, daß die verglichenen Arten sicher aus gleichen Umweltsbedingungen herkommen.

Kleine Bäumchen von *Bulbochaete setigera* Ag., im März untersucht, färbten sich langsam diffus rosa und zeigten eine relativ spät eintretende, mäßige Kontraktion der Vakuolen.

2. Zygnemataceae.

Nicht uninteressant war im Vergleich mit den genannten Fadenalgen das Färbeverhalten einer kleinen (9 bis 10 μ breiten) *Mougeotia* sp. Bei rascher, starker Färbung waren die Fäden der uns vorliegenden Art zum Teil empfindlich, bei Kurzfärbung (1 : 2000 durch $2^1/_2$ Minuten) und folgender langsamer Farbstoffabsorption vom Detritus her hielten die Zellen aus. Nach einer Stunde war der Zellsaft diffus tief rosa und unkontrahiert, außerdem lagen aber im Zytoplasma etliche schwarzrot gefärbte Körnchen, die wohl die ursprünglich bei *Mougeotia* vorhandenen Gerbstoffvakuolen in etwas geschrumpftem Zustande darstellen. Die Färbung des Zellsaftes und die intensivere Färbung der Körner im Plasma sind hier nebeneinander sichtbar. Daß sich *Zygnema* bei vitaler Färbung ähnlich verhalten kann, ist bekannt. (Pfeffer 1886, S. 198, 216, Taf. II, Fig. 9, 10.)

3. Desmidiaceae.

Über Vitalfärbung von Desmidiaceen ist nur sehr wenig bekannt, wie denn überhaupt diese in systematisch-morphologischer Hinsicht so vorzüglich durchgearbeitete Algengruppe noch viel zu

wenig zu zellphysiologischen Untersuchungen herangezogen worden ist. Wir fanden hier ein außerordentlich dankbares Arbeitsgebiet.

Schon die ersten Versuche mit Neutralrot zeigten schönste Färbebilder. Vakuolenkontraktion tritt allgemein auf. Da uns der Vorgang von den Oedogonien her, wo er sich in einfachster Form abspielt, geläufig geworden war, ließen sich die wesentlichsten Züge bei den Desmidiaceen wiederfinden.

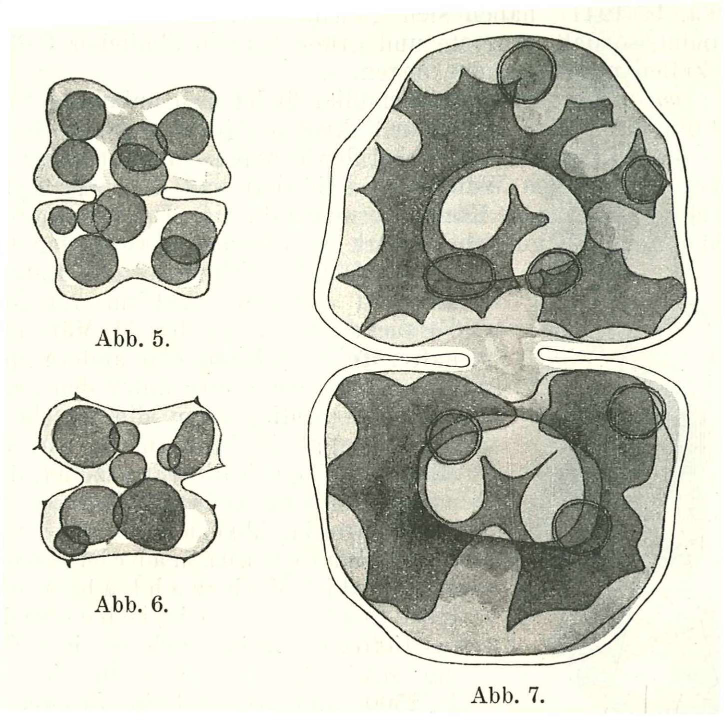


Abb. 5. *Euastrum binale,* **Abb.** 6. *Cosmarium Regnesii,* **Abb.** 7. *Cosmarium difficile.* Vakuolenkontraktion und -zerteilung nach Neutralrotfärbung.

Das Verhalten der zahlreichen in unserem Material vorhandenen Arten läßt sich dahin zusammenfassen, daß allgemein aus schwach alkalischer Neutralrotlösung zunächst eine Diffusfärbung des ganzen Vakuolenraumes zustande kommt, worauf dann meist recht rasch eine Kontraktion, mit Zerfällung der roten Vakuole in zahlreiche Teilstücke verbunden, und Verkleinerung der Teilvakuolen zu relativ kleinen und kleinsten Ellipsoiden und Kugeln

folgt. Wir beschreiben nur einen Teil der von uns beobachteten Arten im einzelnen.

Euastrum binale (Turp.), *Cosmarium Regnesii* Reinsch und andere kleine Desmidiaceen erfahren eine Teilung der Vakuole jeder Zellhälfte in 2 bis 4 Stücke, die sich recht bald zu Kugeln von der aus Abb. 5 u. 6 ersichtlichen Größe zusammenziehen. Die Chloroplasten, die hier relativ dünnflüssig sind (vgl. Eibl 1939 a, b, 1941), haben sich gleichfalls kontrahiert, geteilt und gerundet, so daß nun rote und grüne Kugeln ähnlicher Größe in den Zellen nebeneinander liegen.

Cosmarium difficile Lütkemüller findet sich anfangs öfter mit intakten, diffus rosa gefärbten Vakuolen. Abb. 7 zeigt ein Stadium der Vakuolenkontraktion, wobei der Tonoplast noch in zahlreichen feinen Spitzen dem Wandbelag adhäriert und der rosa Vakuole vieleckig sternförmige Konkavformen aufnötigt. Der Chromatophor ist hier ungeteilt geblieben, stark lichtbrechende Öltropfen treten hervor. Die Art überwinterte in Material 2 gut und stand zur Zeit unserer letzten Versuchsreihe am 17. bis 23. März in lebhafter Teilung. Kaum eine andere Spezies unserer Proben zeigte unter den gegebenen Milieubedingungen die gleiche Teilungsfreudigkeit. Während in einem bestimmten Versuch die Einzelzellen durchwegs Vakuolenzerteilung aufwiesen, waren von den in Teilung stehenden Zellpaaren nur manche kontrahiert, die Mehrzahl aber ohne Kontraktion geblieben und diffus tiefrosa gefärbt; auch an einer Probe, die stark, 12$^1/_2$ Minuten in Neutralrot 1 : 2500, angefärbt und eine Stunde nachher beobachtet wurde, war in den in Teilung begriffenen Zellen die Kontraktion ausgeblieben.

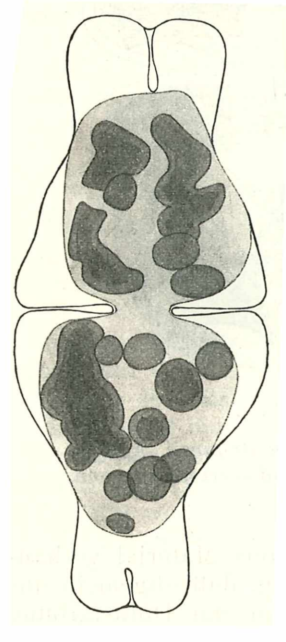


Abb. 8. *Euastrum ansatum*, wie vorig, nachträglich in Traubenzucker plasmolysiert.

Euastrum ansatum Ralfs zeigt etwa ein mittleres Verhalten, anfänglich Diffusfärbung und folgende schwache Verkleinerung der Vakuolen oder Zerteilung derselben in etliche Stücke, von denen die kleineren sich ellipsiodisch runden, die größeren Einkerbungen und kallotenförmige Ausstülpungen zeigen. Da nachträg-

liche Plasmolyse zu Konvexrundung führt (Abb. 8), wird die Intaktheit der dargestellten Zelle bewiesen. Beim großen, im Karches-Moor häufigen *Euastrum affine* Ralfs färbt sich die Vakuole diffus und kontrahiert sodann entschieden relativ träge.

Sehr bemerkenswerte Erscheinungen zeigten zwei große Zieralgen, nämlich der in unserer Probe 2 fast dominante *Tetmemorus granulatus* und das seltenere, aber doch in jedem Präparat zu findende *Closterium (= Penium) libellula*, var. *intermedia*.

Tetmemorus wurde von Weihnachten bis Ostern wiederholt untersucht. Schon nach kürzerer, vorsichtig durchgeführter Färbung zeigt sich in allen intakten Zellen eine Protoplasmaströmung von auffallender Intensität. Es handelt sich um eine lebhafte Zirkulation, die längs des Zellsaumes überall, wo nicht die Chloroplastenlamellen das Bild verdecken, zu beobachten ist. Im Plasma haben sich zahlreiche winzige (< 0,5 μ), unter sich gleich große Mikrosomen dunkelrot gefärbt. Das nach beiden Seiten strömende Plasma schleppt diese dunklen Körnchen mit. Die leicht zu messende Strömungsgeschwindigkeit betrug z. B. 11,2 μ pro Sekunde. Wir empfehlen in Neutralrot gefärbten *Tetmemorus* als ein Schauobjekt für Plasmazirkulation. Der Zellsaft ist in solchen Stadien erst rosa angefärbt und noch unkontrahiert. In einem Versuch vom 19. März 1945 hielt in einer fortlaufend beobachteten Zelle die Plasmaströmung auch nach $2^1/_2$ Stunden unvermindert an, und jetzt erst begann die Vakuolenkontraktion. Wird hingegen stärker gefärbt und dann nach längerer Versuchsdauer beobachtet, so weist die Hauptvakuole regelmäßig schönste Kontraktionsbilder auf. Die Farbspeicherung erfolgt bei *Tetmemorus* lebhaft; die Art übertrifft, wenn man gemischte Algenproben färbt, gewöhnlich in der Konkurrenz die anderen Des-

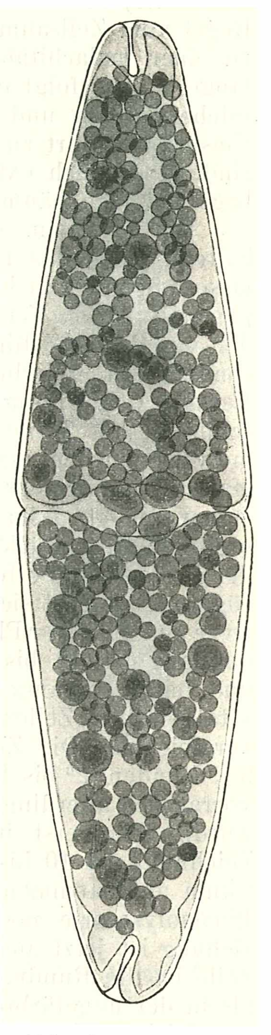


Abb. 9. *Tetmemorus granulatus.* Extreme Vakuolenzerteilung nach Neutralrotfärbung.

midiaceen und erreicht fast die Farbtönung von *Oedogonium*. Die Mehrzahl unserer Versuche fand im Frühwinter (25. Dezember bis 1. Jänner) statt. Die Kontraktionserscheinung begann da in der Regel vom Zellsaum her in Form zahlreicher Einkerbungen, die zu einer malachitähnlichen Konfiguration führen konnten. Nach längerer Zeit folgt oft die Zerfällung des Zellsaftraumes in zahlreiche Kugeln und Ellipsoide ungleicher Größe. Nachträgliche Plasmolyse führt zu Bildern, wie sie in Abb. 10 bis 13 dargestellt sind. Aber auch extremen Zerteilungen in zahlreiche Kügelchen begegnet man häufig (Abb. 9).

Wir möchten, spätere ausführlichere Mitteilung uns vorbehaltend, auch das Plasmolyseverhalten der Art nicht unerwähnt lassen. Schon Klebs (1886, S. 386) hat wahrgenommen, daß bei plasmolytischen Versuchen der Protoplast mit den Zellenden (und den von da ins Zellinnere vorspringenden „Zellstoffbalken") in besonders fester Verbindung bleibt. Eibl (1939 b), der Form und Verlauf der Plasmolyse von *Micrasterias, Netrium, Closterium* schildert, hat *Tetmemorus* nicht untersucht. Wir fanden in Plasmolyseversuchen am 25. 12. bis 1. 1. am frischen ungefärbten Material regelmäßig ein Festhalten der Protoplasten in den Zellenden und etwa im äußeren Drittel der Zellhälften, während im breiteren Mittelstück der Zellen eine ziemlich glatte Längsabhebung der Protoplasten erfolgt. Am Isthmus kann sich die Loslösung verzögern. Es ergibt sich die in Abb. 10 dargestellte Verteilung negativer und positiver Plasmolysesorte. Die Zelle (Abb. 11) war 22 Stunden lang (31. 12. bis 1. 1.) in 0,8 mol Traubenzucker plasmolysiert und hatte so lange die negativen Plasmolyseorte erhalten. Die vitalgefärbten Zellen in Abb. 13 sind mit der ungefärbten Kontrolle vergleichbar. Die Zelle (Abb. 12) hatte eine Dauerfärbung von $9^1/_2$ Stunden (2^h bis $11^h\ 30'$) in Neutralrot 1 : 2000 (wobei der Farbvorrat sich allerdings bald erschöpft haben dürfte) hinter sich und wurde dann erst in 0,8 mol Traubenzucker plasmolysiert. Die Zeichnung ist 10 bis 24 Min. nach der Eintragung ins Plasmolytikum aufgenommen. Man sieht die ursprüngliche Verteilung der Plasmolysesorte noch angedeutet, aber Loslösung und Zurückziehung ist jetzt auch aus den Zellenden erfolgt. Im Mittelteil der Zelle ist die Rundung bzw. Glättung schon weiter fortgeschritten als in der ungefärbten Kontrolle, wiewohl diese wesentlich länger im gleichen Plasmolytikum verweilt hat. Die Zelle in Abb. 13 ist nach der Färbung 21 Stunden gewässert, dann plasmolysiert. Man sieht, daß perfekte Loslösung, also Aufhebung der negativen Plasmolyseorte, und Konvexrundung der Protoplasten erfolgt ist. Oft unterbleibt aber die Verkürzung der Protoplasten und ihre

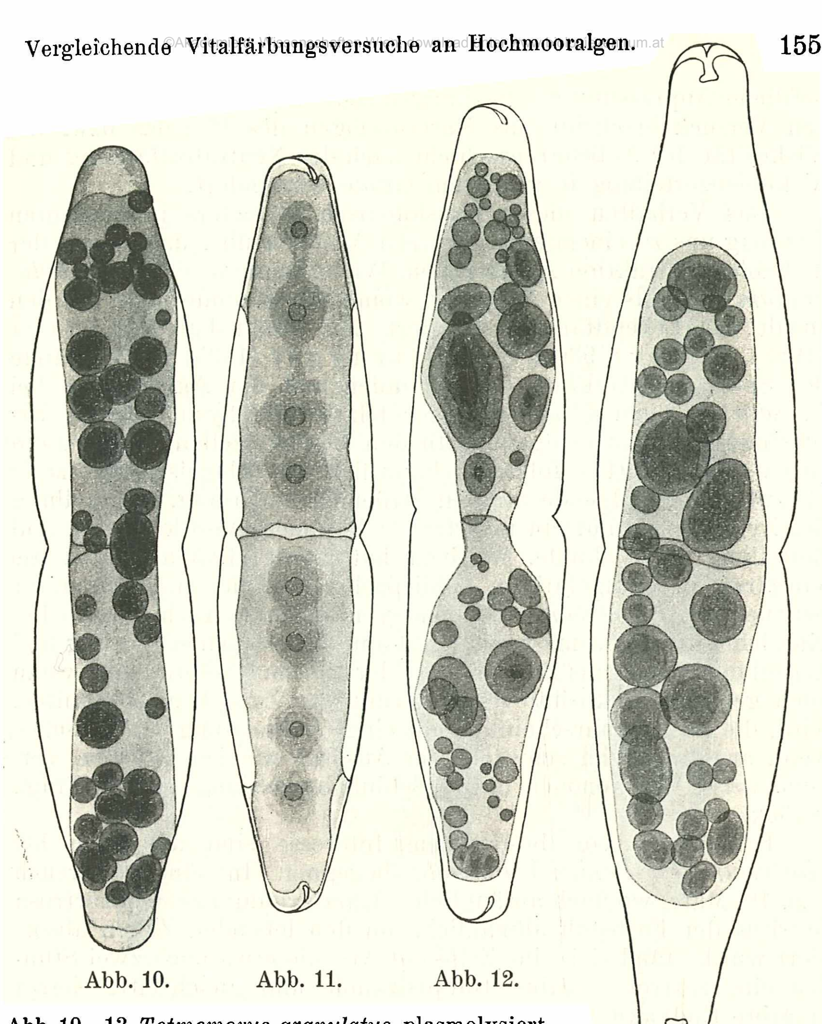


Abb. 10—13. *Tetmemorus granulatus*, plasmolysiert. — Abb. 10 mit Neutralrot 1: 2000 (in Wiener Leitungswasser gelöst) am 31. 12. 1944, 13h 16′—21′, gefärbt, dann in reines Leitungswasser, 14h 44′ 0,8 mol Traubenzucker (in H_2O) zugesetzt, gezeichnet 16h 30′—35′. — Abb. 11 um 15h 15′ ungefärbt in 0,8 mol Traubenzucker, nach 22 Stunden (1. 1. 1945, 13h 05′ f.) gezeichnet; Zelle 185 μ lang, 38 μ breit. — Abb. 12 am 1. 1. 2h in 1: 2000 Neutralrot für 10 Min., dann in Leitungswasser, nach 9½ Stunden plasmolysiert in 0,8 mol Traubenzucker (in Leitungswasser), 12—24 Min. nach dem Einlegen ins Plasmolytikum gezeichnet. — Abb. 13 (vergr. 1000 : 1) 5 Min. gefärbt, dann in Leitungswasser, sodann nach 21 Stunden in 0,8 mol Traubenzucker plasmolysiert. — T. um 14—15° C.

seitliche Anpressung an die Längswände der Zellen. Im angeführten Versuch erscheint das Haftvermögen des Plasmas bzw. die Viskosität der Außengrenzschicht nach der Neutralrotfärbung und Vakuolenzerteilung in gewissem Grade vermindert.

Das Verhalten dieser physiologisch besonders interessanten Art mag uns zu einem ersten kurzen Ausblick über das Wesen der Vakuolenkontraktion Anlaß geben. Wir erkannten schon bei *Oedogonium* diese als einen Vorgang, womit die gesunde Zelle auf den Insult der Lebendfärbung reagiert. Mit Recht haben Küster (1928), Weber (1930 a, b) und Strugger (1935) die Vorgänge der Spontankontraktion der Vakuolen und der Aggregation bei *Drosera* verglichen bzw. zu einer Klasse zellphysiologischer Erscheinungen zusammengefaßt. In den Tentakelzellen von *Drosera* (Åkerman 1917) folgen bekanntlich auf chemische Reizung als aufeinanderfolgende Stadien Strömungsauslösung, Aufquellung des Zytoplasmas auf ein mehrfaches Volumen, Verkleinerung und Zerteilung der Vakuole. Weber hat damit (1930 a) zumal die Vorgänge in vitalgefärbten Schließzellen verglichen. Auch unser Schauobjekt *Tetmemorus* erscheint vergleichbar. Auch hier im Beginn lebhafteste Plasmaströmung, dann Vakuoleneinschnürung und Zerteilung, wobei aus dem Wandel der Plasmolyseform eine wenn auch geringe Viskositätsverminderung des Zytoplasmas manifest wird, die höchstwahrscheinlich mit einer Aufquellung des Plasmas, wenn auch von viel schwächerem Ausmaß wie bei *Drosera*, verbunden ist. Wir kommen in der Schlußbesprechung auf die Frage zurück.

Färbebilder von besonderem Interesse sind uns auch bei *Closterium (= Penium) libellula* begegnet. In einem Versuch vom 19. März, wo nach anfänglicher Kurzfärbung aus dem zartrosa Detritus der Farbstoff allmählich von den lebenden Zellen absorbiert wurde, fand sich eine Zelle der Art, die etwa nach zwei Stunden eine zartrot gefärbte Hauptvakuole und gleichzeitig tiefrot gefärbte Endvakuolen aufwies. Bekanntlich hat Lütkemüller die Spezies unter Berücksichtigung der Schalenstruktur und kriställchenführenden Endvakuolen aus der Gattung *Penium* in die Gattung *Closterium* versetzt, obwohl die Zellform nicht halbmondförmig, sondern symmetrisch nach der Längsachse ist. Die Endvakuolen sind stets vorhanden, kugelig, um 11 μ breit und mit zahlreichen Kriställchen versehen, die oft klumpig aneinanderhaften und dann nahezu den halben Vakuolenraum ausfüllen. Es ist nun eine recht interessante, erstmalig von uns beiden unabhängig voneinander beobachtete Tatsache, daß diese Endvakuolen sich mit Neutralrot stets tiefer und oft mehr violettrosa anfärben als die

Hauptvakuole. Diese beginnt nach einiger Zeit sich zu kontrahieren und zerfällt nachher in viele Teilvakuolen, die sich weiter ver-

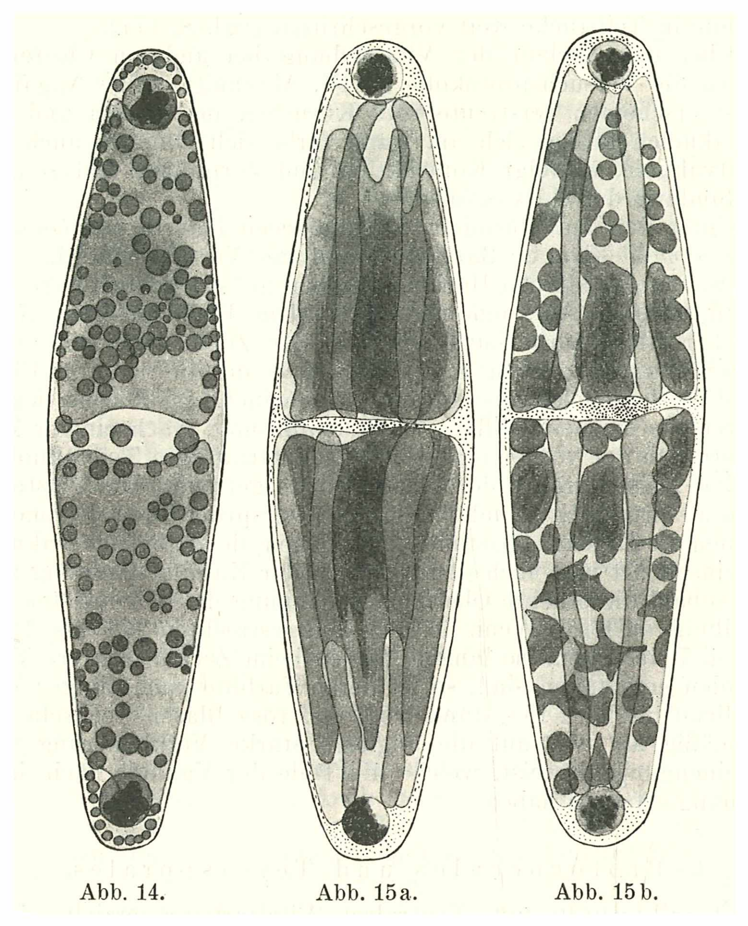


Abb. 14 und 15. *Closterium libellula.* Vakuolenkontraktion. — Abb. 14 in Neutralrot, Abb. 15a, b in Neutralviolett gefärbt; vgl. Text S. 171.

kleinern, wobei sich die Färbung verstärkt, und sich fortschreitend abrunden. In der Endvakuole beobachtet man niemals eine Vakuolenkontraktion. Abb. 15 a und b beziehen sich auf eine Zelle, die am 23. März 1945 nicht mit Neutralrot, sondern mit dem ganz

ähnlich wirkenden Farbstoff Neutralviolett 1 : 200, in Leitungswasser gelöst, seit $9^h 15'$ gefärbt worden war; um $9^h 40'$ zeigt die Zelle beginnende Kontraktion, um $10^h 04'$ ist die Zerfällung der Vakuole in Teilstücke weit vorgeschritten (vgl. S. 171).

Über den Verlauf der Vitalfärbung bei anderen Closterien bringen die Versuchsprotokolle im IV. Abschnitt einige Angaben. Zuerst erscheinen zerstreute rote Körnchen im Plasma und die Endvakuolen färben sich an. Dann färbt sich langsam auch die Hauptvakuole, es folgt Kontraktion und Zerteilung und sodann die Rundung der Teilvakuolen.

Unter den fadenförmigen Desmidiaceen lieferte uns *Gonatozygon monotaenium* de Bary ein prächtiges Versuchsmaterial. Die Alge war uns in alpinen Hochmoorproben nie so reichlich begegnet wie in unseren Aufsammlungen aus dem Fichtelgebirge. Nach basischer Neutralrotfärbung treten in den Zellen einerseits recht große Fällungskügelchen (z. B. 1,3 bis 4 μ) auf, die schon im Übersichtsbild tief rot hervortreten und anscheinend im Plasma liegen, andererseits erscheint diffuse Vakuolenfärbung. Nach einiger Zeit gliedert sich der vorher einheitliche Zellsaftraum in Teilvakuolen. Sie sind meist durch Chloroplastenstücke getrennt. Die Plastiden liegen ursprünglich wandständig, die vorspringenden Pyrenoide scheinen die Stellen zu bestimmen, an denen die angefärbte Vakuole sich einschnürt und nach den Gesetzen der Kapillarspannung zerfällt, sobald die erhöhte Oberflächenspannung des Tonoplasten die Zerteilung auslöst. Wenn in den langgestreckten (11 bis 12 μ breiten, 7- bis 20mal so langen) Zellen beim Zerfall mehrere Teilvakuolen entstanden sind, so ist deren Farbton nach einiger Zeit auffallend ungleich tief, dunkelrote und rosa Blasen wechseln unregelmäßig ab, was auf die ungleich starke Verkleinerung und Farbeinengung hinweist, welche die Teile der Vakuole nach ihrer Trennung erfahren haben.

4. Protococcales und Tetrasporales.

Überall wurde mit Neutralrot Vitalfärbung erzielt, doch herrschte einfache Körnchenfällung vor. Da dieselbe mit dem, was in der Literatur für Hefezellen, Pilze und Algen vielfach beschrieben wurde, wesentlich übereinstimmt, können wir unsere Beobachtungen hier kürzer fassen. Nach dem bekannten Schema von Guilliermond erscheinen bei Hefezellen zunächst in den Vakuolen kleine Entmischungströpfchen, die zusammenfließen, sich an die Vakuolenwand anlegen und an ihr ausbreiten. Dann sollen sie wieder in Lösung gehen und die diffuse Färbung des Zellsaftes

veranlassen können. Oder es werden im Zellsaft rote Granula gefällt, die sich der Vakuolenwand anheften und manchmal zum Teil auch ins Plasma übertreten. Vgl. Guilliermond, Mangenot und Plantefol 1933, S. 291, Küster 1935, S. 360, Guilliermond-Atkinson 1941, S. 136 f., Pierre Dandgeard 1947, S. 443 f.

Bei dem in unseren Proben oft dominierenden *Coelastrum conglomeratum* (vgl. S. 145), welches sehr kräftig anfärbt, erscheinen kleine rote Kügelchen in den Zellen (wir zählten ihrer in einem Präparat, das 12 Minuten in Neutralrot 1 : 2500 behandelt war, nach 20 bis 23 Minuten etwa 15 pro Zelle, alle waren kleiner als 1 μ); 54 Minuten nach Versuchsbeginn hatte die Färbung zugenommen, die Zellen hatten also dem zuerst gefärbten Detritus Farbstoff entzogen, und die Körnchen lagen jetzt dicht und tiefrot über die ganze Zelle verteilt; primär werden sie aber in den Vakuolen gefällt. Schließlich sind in gleichen Versuchen die *Coelastrum*-Zellen oft gepfropft voll großer, schwarzroter Kugeln, und der vorher rote Detritus erscheint entfärbt. Beobachtet man den Färbevorgang in seinem zeitlichen Verlauf, so läßt sich die mit Körnchenfällung einhergehende Vitalfärbung sicher von der durch Vakuolenzerschnürung und -verkleinerung erzeugten unterscheiden, wenngleich bei kleineren Objekten die Endbilder ähnlich aussehen.

Bei Versuchen mit Mischproben läßt sich meist ein ungleich starker Gehalt an Körnchen für die einzelnen, nebeneinanderliegenden, artverschiedenen Algen beobachten. Hingegen weisen die Zellen einer Kolonie — bei *Coelastrum* und anderen Protococcales — zur gleichen Zeit meist fast genau gleichviel und gleichgroße Körnchen auf. In unseren Proben zeigten unter anderen *Oocystis solitaria, Scenedesmus arcuatus* Lemm und zwei nicht bestimmte Tetrasporales die Körnchenfällung, desgleichen andere, unbestimmte Kleinformen. Auch nach langer Zeit blieben die roten Körnchen getrennt nebeneinander, im Gegensatz zur bekannten Tröpfchenfällung in vitalgefärbten Zellsäften höherer Pflanzen, wo die anfangs kleinen Kügelchen gewöhnlich zu „Entmischungskugeln" zusammenfließen.

Auf die Beschreibung der roten Diffusfärbung der Algengallerten können wir im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehen. Es fiel uns auf, daß, wenn stark und kurz angefärbt und sodann Leitungswasser durchgesaugt wurde, die Gallerten nicht „nachfärben", d. h. nicht wie die lebenden Algenprotoplasten nachträglich vom Detritus her die Farbe anreichern.

Um den Fehler vorzeitiger Generalisierung zu vermeiden, sei hervorgehoben, daß sich auch bei manchen einzelligen Chloro-

phyceen Diffusfärbung des Zellsaftes und Kontraktion des Vakuoms beobachten läßt. Doch scheint der durch Körnchenfällung gekennzeichnete Färbetyp entschieden vorzuherrschen.

5. Heterocontae.

In unseren Proben war *Chlorobotrys regularis* Bohlin (det. Prof. Geitler) sehr reichlich vertreten. Die kugelige, 17 bis 20 μ breite Alge mit ihrer scharf gezeichneten Membran, den gelbgrünen, scheibchenförmigen, pyrenoid- und stärkefreien Chromatophoren und 1 bis 2 leuchtend roten Öltröpfchen ist mit keiner Chlorophycee zu verwechseln, wenn man den Blick für die Merkmale der Heteroconten (vgl. Pascher 1925, S. 3, 49) einmal geschärft hat.

Es war nun eine der größten Überraschungen, als wir fanden, daß *Chlorobotrys* sich niemals mit Neutralrot anfärbt. Der Protoplast bleibt stets ungefärbt. Wir vermerkten diese Tatsache bei den ersten Versuchen am 24. Dezember 1944 und fanden sie in allen folgenden Versuchen bis zum 25. März 1945, worin viele tausend Zellen zur Beobachtung kamen, ausnahmslos bestätigt. Sehr eindrucksvoll ist das Bild von Mischproben, die mit Neutralrot 1 : 2500 durch 12 bis 15 Minuten behandelt worden sind, wenn *Coelastrum conglomeratum* gepfropft voll schwarzroter Kügelchen erscheint und *Chlorobotrys* dazwischen völlig ungefärbt geblieben ist. In artenreicheren Präparaten waren oft alle anderen Algen in der alkalischen Neutralrotlösung gefärbt und allein *Chlorobotrys* leuchtete ungefärbt heraus. Die Heteroconte bleibt ebenso ungefärbt, wenn wenig Algen im Tropfen liegen und die Gefahr der Speicherkonkurrenz hinwegfällt.

Hie und da zeigten einzelne Zellindividuen von *Chlorobotrys* eine leichte Membranfärbung. Bei stärkerer Vergrößerung ließ sich dann feststellen, daß, scharf abgegrenzt, allein die innere Membranschicht gefärbt war; die Mehrzahl der Nachbarzellen war völlig ungefärbt. Einmal findet sich in unseren Protokollen die bevorzugt starke Färbung der Innenmembranschicht an eben geteilten Zellen vermerkt. Die Gallerte, worin die Zellen eingebettet sind, kann sich mit Neutralrot deutlich anfärben.

6. Diatomeae.

Wir haben die Lebendfärbung der Diatomeen, worüber ältere Erfahrungen (Cholnoky 1935 a) vorlagen, diesmal bloß nebenher untersucht. In Abb. 16 ist eine mit Neutralrot gefärbte Zelle von

Caloneis sp. wiedergegeben. Sie zeigt leichte diffuse Plasmafärbung und rote Entmischungs- bzw. Fällungskörper. Der Inhalt der Vakuolen ist ungefärbt. Trotzdem ist starke Vakuolenkontraktion eingetreten. Die Tonoplasten sind scharf konturiert. Es geht daraus

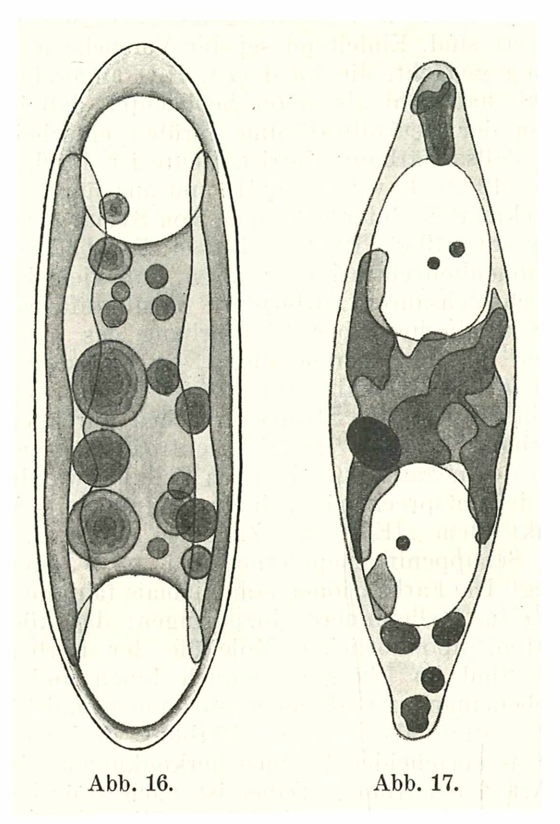


Abb. 16. *Caloneis* **sp., in Neutralrot gefärbt. Vakuole kontrahiert, aber Zellsaft ungefärbt. — Abb. 17.** ***Frustulia.***

hervor, daß die Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung eine Folge der Veränderung des Protoplasmas und nicht des Vakuoms ist.

Ähnlich verlief die Vitalfärbung bei *Frustulia* (Abb. 17), doch erscheinen in der gezeichneten Zelle auch die braunen Chromatophoren kontrahiert (vgl. Plass 1942). Über Pinnularia vgl. S.170.

III. Einzelbeobachtungen mit verschiedenen Farbstoffen.

Unsere Beobachtungen mit anderen Farbstoffen vom Winter 1944/45 hatten mehr orientierenden Charakter und sollen hier nur in Auswahl wiedergegeben werden, soweit sie Befunde gebracht haben, die im Rahmen der vorliegenden vergleichenden Studie erwähnenswert sind. Einleitend sei der Versuche mit Neutralrotlösung gedacht, die in dest. H_2O angesetzt war. Ruhland (1908) hat wohl als erster beobachtet, daß bei *Spirogyra* die Reaktion der Neutralrotlösung darüber entscheidet, ob Zellwand- oder Zellsaftfärbung eintritt. Heute ist durch die Versuche von Bethe (1922), Irwin (1923f) und aus jüngerer Zeit zumal durch die bekannten Untersuchungen von Strugger (1936, 1940) und Drawert (1938, 1940, 1948) in Farbbädern abgestufter Wasserstoffionenkonzentration erwiesen, daß viele basische Farbstoffe aus schwachsauren Farbbädern Membranfärbung, aus neutralen oder alkalischen aber Vitalfärbung des Protoplasten bewirken. Der Umschlagsbereich liegt von Farbstoff zu Farbstoff verschieden in der cH-Skala. Drawert (1940) hat 40 basische Farbstoffe in cH-gestuften Reihenversuchen durchgeprüft. — Die Membranfärbung kommt durch Elektroadsorption der Farbkationen an der negativ aufgeladenen Zellulosewandung zustande und reicht dementsprechend nach der sauren Seite bis zum Entladungspunkt (dem „IEP“) der Zellulose, der z. B. für Zwiebelzellen der Schuppeninnenepidermis bei p_H 3 oder ein wenig darunter liegt. Die Farbkationen sind niemals fähig, durchs lebende Protoplasma ins Zelleninnere einzudringen; das können nur die undissoziierten, lipoidlöslichen Moleküle der Farbbase und des Farbsalzes. Sind im Übergangsbereich Ionen und Moleküle im Farbbad nebeneinander vorhanden, so kann grundsätzlich sowohl Membranadsorption als auch Vitalfärbung des Protoplasten erfolgen, und es entscheidet die Speicherkonkurrenz der Zellenteile über die Art der Färbung. Dabei ist nach Höflers Feststellungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Akridinorange (1948, S. 633) — die aber ebenso für die Färbung mit Hellfeldfarbstoffen Geltung haben — die Zellsaftspeicherung durch chemische Bindung stärker als die Elektroadsorption an der Zellmembran, letztere aber stärker als die Ionenspeicherung in „leeren“, d. h. speicherstofffreien, Zellsäften. Im Einzelfall entscheidet natürlich der prozentuale Anteil der im Farbbad vorhandenen Ionen und Moleküle bei jeder p_H-Stufe über den Erfolg der Färbung.

Die Neutralrotversuche mit Algen bringen gegenüber den Erfahrungen mit Gewebszellen (Strugger l. c., Drawert

l. c., Höfler 1947—1949) nichts grundsätzlich Neues. Doch sind die Algen ein vorzügliches Anschauungsmaterial, mit einfachsten Mitteln Membran- oder Vakuolenfärbung zu erzielen. Färbt man die im vorangehenden Abschnitt behandelten Fadenalgen mit in dest. H_2O hergestellter Neutralrotlösung (p_H 5 bis 5,5), so wird an *Oedogonium*, *Microspora floccosa*, *Gonatozygon monotaenium* eine intensive, oft dunkelrote Zellmembranfärbung bewirkt, die so stark sein kann, daß sie die Zellwände undurchsichtig macht. Bei *Gonatozygon* färbt sich die mit spitzen Wärzchen bewehrte Membran besonders tief rot, die Wärzchen erscheinen schwarzrot.

Nur bei *Microspora floccosa* läßt sich bei entsprechender Einstellung feststellen, daß auch in den Zellen mit gefärbter Membran außerdem die Körnchen im Zellinhalt gefällt worden sind, während ja bei p_H 7,8 (S. 147) bloß Fällung erfolgt und die Zellwand ungefärbt bleibt.

Wenn im Vergleichsversuch mit Neutralrot, welches im kalkhaltigen Wiener Leitungswasser gelöst wurde, die im vorigen Abschnitt geschilderten reinen Vitalfärbungen im Protoplasten auftreten und die Zellwände — selbst bei *Gonatozygon* — völlig ungefärbt bleiben, so hat dies zweierlei Ursachen: 1. das Überwiegen der undissoziierten Farbmoleküle im Farbbad und dazu 2. wohl die blockierende Wirkung der Ca-Ionen des Leitungswassers, welche der Adsorptionsfärbung der Zellmembranen durch die Farbkationen entgegenwirken. Methodisch liegt darin sogar ein gewisser Vorteil der einfach mit Leitungswasser hergestellten Lösung vor den in der Zellphysiologie sonst üblichen, mit Phosphatgemischen gepufferten Lösungen, wenn Vitalfärbung am Protoplasten erzielt werden soll.

Methylenblau ist der Farbstoff, der in Pfeffers (1886) klassischer Untersuchung an zahlreichen Objekten angewandt und seither nächst dem Neutralrot am häufigsten unter den Basenfarbstoffen verwendet worden ist. Wir wissen zumal aus M. Brooks-Moldenhauers (vgl. 1941, S. 248) jahrelangen Studien, daß die phys.-chem. Verhältnisse bei Methylenblau komplizierter sind. Der Umschlagsbereich liegt an sich höher als beim Neutralrot, so daß auch bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion die dissoziierten Kationen Adsorptionfärbung der Zellmembran bewirken können. Allerdings liegt „bei höherer cH das stark dissoziierte Methylenblau selber vor und bei niedriger cH das schwach dissoziierte Trimethylthionen, das wohl vorwiegend von der Zelle aufgenommen wird. Daß aber Methylenblau nicht

nur in alkalischer Lösung die Pflanzenzelle vital zu färben vermag, sondern auch bei höherer cH — vorausgesetzt, daß den Farbstoff speichernde Substanzen vorliegen —, belegen die klassischen Versuche Pfeffers mit gerbstoffführenden Pflanzen wie *Spirogyra*" (Drawert 1949, S. 36).

Das Methylenblau ist dem Leben der Zellen schädlicher als z. B. Neutralrot und Cresylblau. Pfeffer hat Dauerfärbung in sehr stark verdünnten Lösungen angewandt. Färbt man gemischte Algenproben mit den Lösungen der üblichen Konzentration 1:10.000 in H_2O gelöst, so tritt im Übersichtsbild die bekannte Metachromasie hervor: die Mehrzahl der Objekte ist blau, so auch die adsorptiv gefärbten Zellmembranen von *Microspora, Gonatozygon, Gymnozyga* usw. — lila färben sich dagegen kleine Cyanophyceenzellen, die Diatomee *Frustulia rhomboides* und anderes; wir wollen dabei nicht verweilen.

Die Färbung der Gerbstoffbläschen von *Mougeotia, Zygnema* ist allgemein bekannt. Der Färbungs- und Nekroseverlauf bei *Spirogyra* ist bei Cholnoky (1937) beschrieben. — In unseren Versuchen erfolgte die Körnchenfällung bei *Microspora,* den *Protococcales* und *Tetrasporales* ähnlich wie im Neutralrot. Bei anderen Objekten fällt die Färbung von Körnchen im Plasma auf, zu deren Darstellung sich kaum ein anderer Basenfarbstoff so gut eignen dürfte wie das Methylenblau. Der zeitliche Verlauf eines nekrotisch endenden Färbeversuches wird im nächsten Abschnitt (S. 172) beschrieben.

In Versuchen, die im September 1947 am großzelligen, zur Beobachtung besonders günstigen *Closterium lunula* (aus dem Ibmer Moor) angestellt wurden, färbten sich solche Plasmakörnchen kräftig an. Bei der genannten Zieralge befindet sich bekanntlich eine dünne äußere Plasmaschicht in ständiger Rotationsströmung. Die von Methylenblau gefällten Körnchen werden vom Plasma mitgeschleppt, wodurch einerseits ihre Lage im Plasma, anderseits der vitale Charakter der Färbung unmittelbar bewiesen wird. Auch zeigt sich, daß in den Endvakuolen von *Cl. lunula* zweierlei Körnchen in BMB sich finden, nämlich 1. die tafelförmigen Gipskriställchen (Kopetzky-Rechtperg 1931, vgl. Krieger 1933, S. 38), die farblos bleiben, und 2. intensiv blaue Fällungskügelchen. In frisch gelöster Methylenblaulösung 1:5000 färbten sich zuerst die Zellwände leicht blau, sodann bald im Plasma zahlreiche Mikrosomen, die zittern und strömen, zu satt himmelblauer Färbung, sie fließen schon 10 Minuten nach Versuchsbeginn zum Teil zu größeren blauen Kügelchen zusammen: nun lösen sich die Chloroplastenleisten stellenweise vom plasmati-

schen Wandbelag, so daß die leicht diffus blau gefärbte Vakuole innerhalb des strömenden Plasmas sichtbar wird, welches in seiner Grundmasse farblos geblieben ist. Nach 14 Minuten sind die größeren Körnchen im Wandbelag geballt, sie werden aber noch von der Strömung mitgeschleppt. Nach 30 Minuten hält die Strömung an, doch ist an den Zellenden innen an der polaren Membranverdickung ein schmaler, stark gefärbter, sichelförmiger Streifen zu sehen, der wohl aus zusammengedrängten, von dem hier umkehrenden Plasmastrom abgesetzten Mikrosomen besteht. (Ähnliche blaue Endsicheln unter den Zellpolen sind bei vitalgefärbtem *Netrium digitus* recht auffällig). — Bei einseitigem Farbzutritt färbten sich bei *Cl. lunula* zunächst die Zellmembranen von einer Seite her bis über die Zellmitte blau. Durch solche Methylenblaufärbung ließ sich eine partielle Nekrose der großen Zellen herbeiführen. Im überfärbten Zellende war die Plasmaströmung bereits sistiert und die Endvakuole zerstört, auf der anderen Seite war die Endvakuole erhalten und die Plasmaströmung hielt an.

Auffällig verhielt sich in derselben Versuchsreihe *Pinnularia viridis*. Die pektinhaltige Membran der *Diatomee* färbte sich mit Methylenblau tief blau (nicht violett), der lebende Chromatophor zeigte sich in der Gürtelbandansicht nach 15 Minuten Farbeinwirkung durch große Löcher mit lappig-buchtigem Saum unterbrochen. Vgl. Barg 1943, S. 121.

Das Neutralviolett steht chemisch dem Neutralrot nahe und wirkt als Vitalfarbstoff ähnlich. Leider sind für diesen Farbstoff die physikalischen Eigenschaften und das Tinktionsvermögen in ihrer Abhängigkeit von der cH — welche Drawert (1940) für 40 andere basische Farbstoffe geprüft hat — noch nicht bekannt. Über die Wirkung von Neutralviolett und Prune pure wird im nächsten Abschnitt an Hand einiger Originalprotokolle berichtet.

Aus unseren spärlichen vergleichenden Färbeversuchen mit Safranin sei nur die starke Tinktionskraft dieses Farbstoffs für Zellmembranen (vgl. Cholnoky 1935, 1937) hervorgehoben. — Bei *Chlorobotrys* hat sich einmal eine besonders schöne Elektivfärbung der scharf abgesetzten inneren Zellwandschicht mit Safranin beobachten lassen, was vielleicht auf den Gehalt dieser Schicht an Pektinstoffen hinweist.

Über Fluoreszenzfärbung unserer Hochmooralgen mit Akridinorange liegen nur zwei Versuchsreihen vom 25. und 26. I. 1945 vor, die nicht ausreichen und es nicht gerechtfertigt er-

scheinen lassen, das große, fast unbearbeitete Gebiet der Fluorochromierung von Algenzellen hier anzuschneiden. Über Pilze, Myxomyzeten und Bakterien (vgl. Strugger 1949) liegen ja schon reiche Erfahrungen vor. Nur ein für die weitere Diskussion wichtiges Ergebnis unserer ersten Versuche sei mitgeteilt. Die meisten Algen speichern das Akridinorange (aus alkalischem Farbbad) im Zellsaft mit roter Fluoreszenzfarbe, so wie es die „leeren", speicherstoffreien Vakuome höherer Pflanzen tun (Höfler 1946, 1947.) Durch grün fluoreszierende Farbspeicherung fielen in unseren Proben Fadenstücke von winterlichem *Zygnema* auf.

IV. Zeitlicher Verlauf der Vitalfärbung.

Wenn Feinheiten im zellphysiologischen Verhalten aufgedeckt werden sollen, so genügt die Beobachtung des perfekten Färbebildes meist nicht; dann muß der Vorgang der Lebendfärbung und Farbspeicherung von Anfang an direkt an der Einzelzelle verfolgt werden. Die Beobachtung muß unter dem Deckglas bei ständiger mikroskopischer Kontrolle durchgeführt werden.

Wir geben hier eine Auswahl solcher Versuche wieder, die der erstgenannte Verfasser im Februar 1945 angestellt hat. Die mitgeteilten Originalprotokolle sollen für sich sprechen.

Material „Ibmer Moor" Dose 1

Closterium Dianae Neutralrot 0,01% 6. 2. 1945

Neutralrot 1 : 10.000 in Leitungswasser dem Präparat zugesetzt.

Zuerst (schon nach 1 Min.) werden Körnchen in den Zellpolen und einige zerstreut liegende in der Zelle gefärbt.

Nach $1^1/_2$—2 Min.: Körnchen in der Zelle schon lebhaft rot. Rote Körnchen in den Endvakuolen lebhaft in BMB.

Nach 4 Min.: Pyrenoide treten deutlich hervor (ein wenig rosa angefärbt).

Nach 7 Min.: An den Endvakuolen deutliche Formveränderungen.

Nach 8 Min.: Die ersten Anzeichen einer Färbung der Hauptvakuolen (schattenhafte Konturen).

Nach 12 Min.: Deutliche Vakuomfärbung und Kontraktion.

Nach 17 Min.: Vakuolenkontraktion! Färbung sehr deutlich, aber noch nicht zu stark. — Die Endvakuolen ändern ihre Form nicht mehr, die Körnchen in ihnen sind an der Vakuolenwand gelagert, unbewegt.

Nach 28 Min.: Die Hauptvakuolen sind zu in Längsreihen geordneten, länglich-ellipsoidischen Teilvakuolen zerfallen.

Nach 30 Min. (Abb. 18 a): Die zuerst leicht gefärbten Körnchen verschwinden. In der Zeichnung nur mehr zwei sichtbar. Pyrenoide sehr scharf hervortretend, kaum gefärbt.

Nach 33 Min.: Endvakuolen bedeutend stärker als das übrige Vakuom gefärbt. Die kontrahierten Teilvakuolen runden sich immer mehr ab.
Nach 39 Min.: Vakuolenstücke größtenteils kugelig abgerundet. Endvakuole kugelig, neben ihr erscheint eine andere ebenso stark gefärbte.

Abb. 18a.

Abb. 18 d.

Abb. 19.

Abb. 18b. Abb. 18c.

Abb. 18. *Closterium Dianae*, in Neutralrot 1 : 10.000, vgl. Protokoll vom 6. 2. 1945. **Abb.** 19 in Neutralviolett 1 : 5000, vgl. Protokoll vom 13. 2. 1945.

Nach 33—44 Min. (Abb. 18 b): Ein Körnchen daneben aufgetreten, das in der 45. Min. wieder verschwindet.

Nach 72 Min.: Die Zelle ist voll von unregelmäßig verteilten, völlig abgerundeten Teilvakuolen, die jetzt ebenso stark wie die Endvakuole gefärbt sind, zum Teil vielleicht noch stärker. Endvakuole hat sich stark vergrößert (Abb. 18 c).

Nach 77 Min.: Endvakuolen platzen auf. Ein unscharf konturierter Rest, noch rosa gefärbt, rückt ins Zellende (Abb. 18 d). — Desorganisation beginnt. Chromatophoren werden körnig.

Aufs deutlichste zeigt sich, daß die gefärbten Körnchen im Plasma schon sehr bald nach dem Beginn der Färbung erscheinen, während die Vakuolenfärbung erst viel später und nur ganz allmählich einsetzt. Das zeigen auch die folgenden Versuche.

Closterium sp. Neutralrot 7. 2. 1945

10h 00′ Neutralrot 1 : 1000 in Leitungswasser dem Präparat zugesetzt.

10h 02′ Zerstreute rote Körnchen im Plasma, Endvakuolen deutlich gefärbt.

10h 04′ Körnchen lebhaft, Endvakuolen deutlich, Hauptvakuolen leicht gefärbt.

10h 05′ Hauptvakuolen deutlicher gefärbt.

10h 10′ Vakuolenfärbung intensiver, besonders an der Konvexseite der Zelle. Endvakuolen und Körnchen im Plasma deutlich gefärbt. Auch Zellwandung leicht gefärbt, gelblich rot.

10h 12′ Anfänge der Vakuolenkontraktion.

10h 15′ Pyrenoide (17 an der Zahl) leicht angefärbt, einzelne Körnchen an der Pyrenoidoberfläche besonders deutlich. Vakuolenkontraktion deutlich, Endvakuolen noch intensiver gefärbt als die anderen.

10h 15′ Körnchen im Plasma intensiv gefärbt. Lage der kontrahierten Teilvakuolen im Protoplasten klar sichtbar.

11h 02′ Plastiden degeneriert, Körnchen im Plasma sehr spärlich, Vakuom in viele kleine Teile zerteilt, diese jetzt ebenso stark wie die Endvakuolen gefärbt, Zellwände farblos.

11h 28′ Vakuom jetzt in allen Zellen in kleine kugelige Teilvakuolen aufgelöst, von welchen einige stärker, einige schwächer gefärbt sind. Endvakuolen sind noch vorhanden, etwa so stark wie die schwächer gefärbten Teilvakuolen gefärbt.

11h 31′ Die Endvakuolen bewegen sich, sie liegen zum Teil weiter, zum Teil näher an den Zellpolen. Bewegungen erfolgen sehr unregelmäßig. Von den stark gefärbten Körnchen im Plasma sind nur sehr wenige mehr vorhanden.

11h 40′ Die Lage ist unverändert.

Im selben Versuch wurde beobachtet eine Zelle von

Netrium digitus Neutralrot 7. 2. 1945

10h 00′ Farblösung zugesetzt.

10h 06′ Körnchen im Plasma leicht gefärbt, besonders an den Polen. Hier Körnchenansammlung sichtbar. Alle Körnchen in BMB.

10h 08′ Ganz zarte diffuse Färbung. Zellwände ungefärbt.

10h 10′ Vakuom noch immer nur zart gefärbt. Körnchen intensiv, einzelne besonders deutlich. BMB lebhaft, besonders an den Polen. Unter den Körnchen sind mehrere, die stark lichtbrechend sind, ungefärbt.
10h 30′ Hie und da ist die BMB schon sistiert. Plasmaströmung aber vorhanden. Färbung noch immer diffus. An den Polen erscheint aber eine ungefärbte Schicht mit unregelmäßigen Konturen. Körnchen im Plasma sehr intensiv gefärbt, sie zeigen noch BMB.
10h 35′ An den Zellpolen wird die BMB immer schwächer, an einem Pol hört sie auf. Plasmaströmung in einzelnen Abschnitten stark.
10h 55′ Färbung noch immer diffus, aber lebhaft. BMB nur hie und da mehr vorhanden, in einzelnen Abschnitten. Hie und da schwache Plasmaströmung. Körnchen im Plasma vergrößert, zum Teil fast schwarzrot gefärbt, ihre Zahl ist kleiner geworden. Auch die ungefärbten stark lichtbrechenden Körnchen sind vorhanden.
11h 11′ Körnchen im Plasma intensiv gefärbt. An einzelnen Stellen schwache BMB. Am Zellende keine auffallenden Körnchenansammlungen mehr. Diffuse Färbung des Vakuoms unverändert.
11h 25′ Zeichnung der Zelle beendet. Der Chromatophor erscheint intakt. Zellsaft diffus rot.

Das Vakuom hat hier bei Netrium somit keine Kontraktion erfahren.

Material „Ibmer Moor“.

Closterium Dianae Neutralviolett 1 : 5000 13. 2. 1945

9h 30′ Farblösung unter Deckglas gesaugt.
9h 31′ Im Plasma zerstreute Körnchen lebhaft gefärbt, deren Anzahl und Größe zunimmt.
9h 33′ Körnchen stark vergrößert, kugelig, Wachstum dauert an, Anzahl bleibt gleich. — Auch Körnchen in der Endvakuole lebhaft gefärbt.
9h 34′ Zellsaft der Endvakuole ungefärbt. Die Körnchen darin verklumpt.
9h 36′ Körnchen im Plasma bis auf 3 bis 4 μ angewachsen, sehr lebhaft gefärbt.
9h 44′ Alle Körnchen sehr beträchtlich, bis auf 4 bis 5 μ angewachsen, kugelig.
9h 46′ Endvakuolen verschwunden. Die (verklumpten) Körnchen liegen noch an Ort und Stelle.
9h 50′—10h 03′ Zelle gezeichnet. Vgl. Abb. 19.
10h 04′ Körnchen sehr groß geworden. BMB schon lange (seit den ersten Minuten des Versuches) völlig sistiert.
10h 25′ Verklumpte Körnchen der Endvakuolen teilweise bis in die Zellspitzen vorgerückt. Vgl. Abb. 19.
10h 31′ Schwache (vorläufig diffuse) Kernfärbung bemerkbar.

Im selben Versuch wurden beobachtet:

Closterium (= Penium) libellula 13. 2. 1945

10h 06′ Ebenfalls Fällungskörper im Plasma. Keine Vakuolenfärbung.
10h 34′ Starke Kontraktion des Chromatophors (ganz entartet). Körner im Plasma je nach dem Abstand von der Wand verschieden groß. Plasma (auch Zellwandung?) erscheint leicht diffus gefärbt.
10h 40′—50′ Zelle gezeichnet (nur die Körner, die im optischen Querschnitt liegen, eingezeichnet.

Pinnularia digitus 13. 2. 1945

10h 08′ Keine Vakuolenfärbung. Vereinzelte, relativ kleine violette Körner. Vakuolenkontraktion. Tonoplasten konvex. Schwache Anfärbung der Plasmabrücke und lebhaftere des Kernes; diese vergrößert, Struktur sieht prophaseartig aus. Die gefärbten Körner schmiegen sich dem Tonoplasten von außen, von der Seite des Plasmas her an.

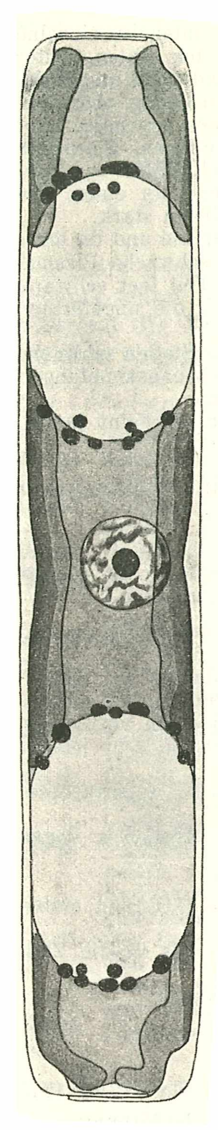


Abb. 20. *Pinnularia digitus*, in Neutralviolett 1 : 5000, 13. 2. 1945.

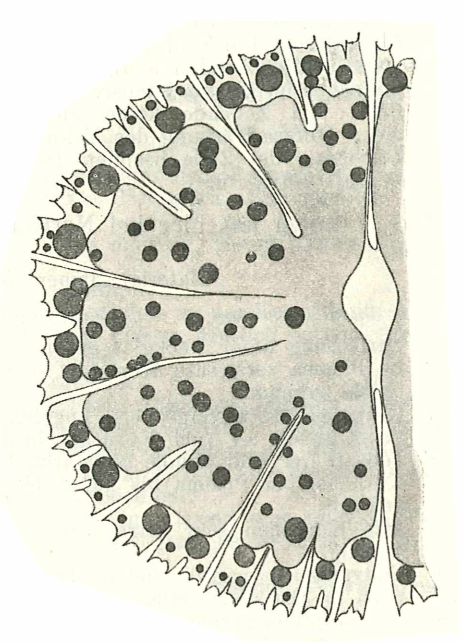


Abb. 21. *Micrasterias sol*, in Neutralviolett, 14. 2. 1945.

11h 07′ Die violetten Körner überall vorhanden. Kernanfärbung (und Degeneration) ganz allgemein. Vakuolenkontraktion ist aber bei vielen Individuen nicht vorhanden (wohl inzwischen verschwunden? Um 10h waren die Vakuolen fast allgemein kontrahiert).

11h 12′ Kollapsus der Protoplasten fängt an, besonders wo Vakuolenkontraktion vorliegt. Allgemein, bei allen Individuen schwache Färbung der Zellmembran.

Micrasterias sol Neutralviolett 1 : 2000 14. 2. 1945

9h 45′ Farblösung (in Leitungswasser) zugesetzt.
9h 46′ Zarte diffuse Plasmafärbung. Winzige, mäßig stark gefärbte Körnchen erscheinen. Kontraktion des Chromatophors.
9h 48′ Die Chromatophorenden ziehen sich aus den Zellappen zurück und beginnen sich abzurunden. Körnchen größer, zahlreicher. Diffuse Färbung erhalten.
9h 49′ Die Körnchen vergrößern sich.
9h 51′ Schwache Plasmaströmung. Die Körnchen sind zu 2 bis 3 μ großen kugeligen, stark gefärbten Gebilden herangewachsen.
9h 52′ Zusammenziehung des Chromatophors geht weiter.
9h 58′ Körnchen weiter angewachsen. Diffuse Färbung schwächer. Plasmabewegung hat aufgehört.
10h 04′ Körnchen zahlreicher. Die früher gesehenen sind zu ansehnlicher Größe (4 bis 5 μ) angewachsen, andere sind kleiner. Alle lebhaft gefärbt.
10h 10′ Zahl der Körnchen recht beträchtlich. Größe 1 bis 5 μ, alle stark gefärbt.
10h 12′ Diffusfärbung nur mehr ganz schwach.
10h 45′ Diffuse Färbung sehr zart, fast ganz verschwunden. Zellwände ungefärbt. Violette Körner unverändert.
11h 07′ Fast unverändert, nur die Körner sehr groß geworden. Plasma immer noch sehr zart diffus gefärbt. — Gezeichnet (Abb. 21) 11h 10′—45′.
11h 53′ Zustand unverändert. Diffuse Plasmafärbung noch zarter.

Wir schließen ein Protokoll an, das sich auf die in Abb. 15 (S. 157) dargestellten Zellindividuen bezieht; es enthält die für das Verständnis der Figuren nötigen Zeitangaben. Hier wurden — wie in den meisten anderen, nicht im einzelnen mitgeteilten Versuchen beider Verfasser — jeweils am selben Versuch nacheinander verschiedene Algen beobachtet.

Material Karches 2 Neutralviolett 1 : 2000 23. 3. 1945

9h 15′ Farblösung (in Leitungswasser) zugesetzt.
9h 25′ *Micrasterias (sol):* „Entmischungskörner“ (im Plasma) zerstreut, wachsen an.
9h 27′ *Micrasterias* (*sol*): Erste Anzeichen der Vakuolenfärbung.
9h 28′ Die „Entmischungskörner“ sind ansehnlich groß geworden (bis 1,7 μ, manche wohl über 2 μ).
9h 32′ *Euastrum* sp. Diffuse Vakuolenfärbung, keine Spur von „Entmischungskörnern“.
9h 35′ *Oedogonium* sp.: Überall starke Vakuolenkontraktion.
9h 36′ *Micrasterias,* anderes Exemplar: Vakuolenkontraktion. Hier (jetzt) keine „Entmischungskörner“.
9h 40′ *Closterium libellula:* Schwache diffuse Vakuolenfärbung, beginnende Kontraktion, Endvakuolen sehr lebhaft gefärbt (gezeichnet, Abb. 15 a, S. 157).
10h 00′ *Closterium libellula:* Vakuolenkontraktion schreitet vor. Vakuom zerfällt in einzelne Stücke, die stärker gefärbt sind. Da die Endvakuolen von der Intensität der Färbung vieles eingebüßt haben, sind sie jetzt nicht mehr viel stärker als die Hauptvakuole gefärbt.

10h 04′ *Closterium libellula:* Endvakuolen und Hauptvakuom bzw. dessen Teile gleich stark gefärbt, nur die Körnchen etwas stärker. Vakuolenzerklüftung (gezeichnet, Abb. 15 b).
10h 28′ *Oedogonium* sp.: Überall Endstadien der Vakuolenkontraktion, Teilvakuolen stark gefärbt.
10h 40′ *Tetmemorus granulatus:* Überall Endstadien der Vakuolenkontraktion. Vakuom in Kugeln aufgelöst, diese stark gefärbt (gezeichnet, Abb. 12).

Closterium libellula Methylenblau 1 : 5000 17. 2. 1945

10h 48′ Farblösung (in Leitungswasser) zugesetzt.
10h 50′ Schwache Membranfärbung, schwache diffuse Plasmafärbung.
10h 52′ Im Plasma erscheinen winzige blau gefärbte Körnchen (ob sie vorgebildet waren?). Körnchen in BMB. Auch schwache Plasmaströmung vorhanden.
10h 56′ Körnchen zahlreicher. Wandung wieder farblos.
10h 57′ An einem Pol eine sehr intensiv gefärbte Kappe innerhalb der Wände.
10h 59′ Die Zahl der intensiv gefärbten Körnchen steigt. BMB hat aufgehört.
11h 01′ Die blaue Kappe scheint in Einzelteilchen zu zerfallen (spielt sich ein Entmischungsvorgang ab?).
11h 02′ Körnchen zahlreicher im ganzen Protoplasma, sie verballen, verklumpen sich. Besonders viele in der äußersten Plasmaschicht.
11h 05′ An dem Pol, wo sich die gefärbte Kappe zeigte, diffuse Plasmafärbung und viele blaue Kügelchen.
11h 07′ Die Zipfel der Plastiden färben sich schwach diffus an, besonders an den Zellenden.
11h 08′ Die diffuse Plasmafärbung verschwindet allmählich, dagegen vermehren sich die „Entmischungskügelchen“. Am Pol ist diffuse Färbung auch schwächer, aber doch deutlich.
11h 16′ Erneut Farblösung zugesetzt; demzufolge intensivere diffuse Plasmafärbung (besonders an dem der zutretenden Farblösung ausgesetzten Pol, wo auch die Kappe entstand).
11h 17′ Chromatophoren zeigen eine feinkörnige Struktur und schwache diffuse Färbung.
11h 18′ Die diffuse Plasmafärbung wird heller, dagegen vermehren sich die „Entmischungskugeln“, Körnchen auch etwas größer.
11h 20′ Am Rande des Chromatophors erscheinen winzig kleine, intensiver gefärbte Körnchen.
11h 21′ Die diffuse Plasmafärbung verliert ihre Gleichmäßigkeit. Färbung erscheint nur mehr feinkörnig. Die größeren „Entmischungskörner“ bleiben, vergrößern sich noch ein wenig.
11h 25′ Die Kappe unterm Zellpol hat sich vollkommen in eine größere Zahl von distinkten Körnchen aufgelöst, die den „Entmischungskörnchen“ gleichen.
11h 26′ Chromatophorenfärbung bleibt schwach diffus, Struktur wie früher feinkörnig.
11h 27′ Wo die diffuse Färbung des Plasmas intensiver ist, tritt auch eine ± Wandfärbung auf.
11h 28′ An diesen Stellen sind die Plastidenzipfel eingezogen, der Chromatophor kontrahiert. Seine Umrisse sind vereinfacht, Streben nach Abrundung unverkennbar.

11h 30′ Diffuse Plasmafärbung wird wieder schwächer, „Entmischungskörner“ wachsen ein wenig an.

11h 35′ Diffuse Färbung noch heller, Zellwandfärbung.

12h 02′ Zellwand entfärbt, diffuse Plasmafärbung kaum sichtbar, „Entmischungskörner“ stark vergrößert, sehr stark gefärbt. BMB nirgends vorhanden.

12h 25′ „Entmischungskörner“ scheinen nach Verballung miteinander zu verschmelzen, da sie weniger zahlreich, aber viel größer geworden sind (jetzt messen die größten 2 μ). Mehrfach Aggregate aus 2 bis 4 gleich oder ungleich großen Körnern sichtbar. — Wandfärbung und diffuse Plasmafärbung vollkommen verschwunden.

Hier sind vor allem die Entmischungserscheinungen im Plasma auffällig. Gefärbte Körnchen im Plasma erscheinen im Methylenblau sehr bald nach dem Beginn der Färbung; sie werden dann immer zahlreicher und größer. Ähnliche Vorgänge wurden früher (Cholnoky 1937, S. 950/51) für *Spirogyra*-Zellen ausführlich beschrieben und diskutiert. „Aus alledem folgt, daß die in die Zelle eintretenden Farbstoffmoleküle schon im Zytoplasma zu gewissen Molekülen der Plasmakolloide gebunden werden, die nach dieser chemischen Veränderung nicht mehr ihre ursprüngliche kolloidale Form behalten können. So lassen sich die Entmischungserscheinungen am leichtesten verstehen, da solche sofort nach Beginn der Lebendfärbung zu beobachten sind.“ Es wurde gezeigt, „daß die Farbstoffe nicht nur von den Stoffen der Vakuole, sondern auch von denen des Plasmas gewisse zur Entmischung zwingen“ und „daß weder der Farbstoff selbst noch die Farbstoffverbindung die Zelle verlassen kann. Wenn es sich also bei der Entmischung um lebenswichtige Stoffe handelt, ist der Vorgang irreversibel und immer letal.“

In der Methylenblaulösung schreitet in unseren Versuchen die Körnchenentmischung im Plasma weiter fort und führt zur Bildung größerer Entmischungskörperchen als in der dem Leben der Zellen unschädlicheren Neutralrotlösung.

V. Besprechung und Zusammenfassung.

Unsere Vitalfärbungsstudien an Hochmooralgen sind von vergleichend-zytologischer Fragestellung her unternommen worden. Wir haben mit basischen Farbstoffen, zumal mit Neutralrot, zahlreiche Arten in Mischproben in ihrer natürlichen Vergesellschaftung untersucht, wodurch verbürgt wurde, daß die erzielten Färbebilder jeweils vergleichbar und nicht durch ungleiche Versuchsbedingungen verursacht sind.

Das Speichervermögen erweist sich nicht nur quantitativ ver-

schieden, sondern die Art der Vitalfärbung ist vielfach auch qualitativ kennzeichnend für die einzelnen Algenarten.

Adsorptionsfärbung der Zellwände durch Farbkationen ist stets leicht und gut zu unterscheiden von eigentlicher Vitalfärbung des Protoplasten. Letztere kann nur zustande kommen, wenn undissoziierte, lipoidlösliche, permeierfähige Moleküle des Farbstoffs im Farbbad geboten werden und wenn die Farbe im Zellinneren auf irgendeine Weise gespeichert wird, so daß dauernd ein Diffusionsgefälle bestehen bleibt und neue Farbmoleküle nachrücken können.

Die Speicherung kann bekanntlich auf verschiedene Art erfolgen, nämlich:

A. Im Zellsaft:

1. durch Bildung unlöslicher, fester Niederschläge, z. B. Krümelbildung in gerbstoffhaltigen Vakuolen,
2. unter Bildung gefärbter Tröpfchen, die anfangs BMB zeigen und oft durch Berührung zu größeren Kugeln, den sogenannten Entmischungskugeln, zusammenfließen,
3. unter kristallinischer Ausfällung,
4. durch Löslichkeitsspeicherung, wobei die gefärbten Reaktionsprodukte gelöst und diffus im Vakuom verteilt bleiben.

Bei 1. bis 4. müssen Speicherstoffe im Zellsaft vorhanden sein, die mit dem eindringenden Farbstoff permeierunfähige Verbindungen eingehen.

Dazu kommt

5. Farbionenspeicherung in Zellsäften.

Sie kommt so zustande, daß Moleküle des basischen Farbstoffs aus alkalischer oder neutraler Außenlösung durchs Plasma in den leicht sauren Zellsaft permeieren und hier zu Ionen dissoziieren, die infolge ihrer Lipoidunlöslichkeit nicht wieder durchs Plasma exosmieren können. Solche Ionenfärbung kann auch in speicherstofffreien Zellsäften erfolgen, also ohne daß speichernde, mit der Farbe chemisch reagierende Stoffe im Zellsaft vorhanden sind.

B. Vitalfärbung im Plasma kommt zustande:

1. durch diffuse Färbung der Plasmagrundmasse, welche zumal durch gewisse Plasmafarbstoffe erfolgt, die von uns aber diesmal nicht angewandt wurde[1].

[1] Wie Strugger (1940 b) nachgewiesen hat, wird auch Neutralrot in den Plasmalipoiden vital gespeichert, es bleibt aber im Hellfeldmikroskop unsichtbar und ist nur im UV-Licht des Fluoreszenzmikroskops sichtbar.

2. durch Färbung disperser Teilchen, zumal durch vitale Färbung schon vorhandener Mikrosomen,
3. durch chemische Reaktion mit farbstoffbindenden Plasmakomponenten, welche durch die aufgenommenen Farbstoffe unter Entmischung dem Protoplasma entzogen werden können.

Die Möglichkeit einer Entmischung im Zytoplasma infolge der Farbstoffaufnahme ist früher (Cholnoky 1937) für *Spirogyra* bewiesen worden und spielt bei der Plasmanekrose durch Färbung und Überfärbung eine wichtige Rolle. Der in Abschnitt IV mitgeteilte Methylenblau-Versuch brachte ein Beispiel.

Auch das viel harmlosere Neutralrot bewirkt bei vielen Zellobjekten die Färbung grobdisperser Phasen im Plasma. Unter unseren Objekten ist die Zieralge *Tetmemorus granulatus* ein Beispiel dafür, daß zahlreiche winzige, unter sich gleich große Mikrosomen sich im Plasma dunkelrot anfärben und, ohne zu verschmelzen, vom Zirkulationsstrom stundenlang mitgeführt werden. Die Mikrosomen waren in diesem Fall wohl sicher schon vorher in der ungefärbten Zelle vorhanden.

Bei vielen anderen Desmidiaceen erfolgt die Fällung gefärbter Körnchen in einer für die Spezies typischen Weise im Plasma, wobei es freilich vielfach unentschieden bleibt, ob die Körnchen im intakten Plasma vorgebildet waren oder ob sie unter dem Einfluß des Farbstoffs erst entstanden sind. Daß solche Körnchen im Lauf der Versuche im noch lebenden Plasma anwachsen, ist in den fortlaufend beobachteten Einzelzellen des öfteren konstatiert worden. Bei manchen Algen, z. B. den von uns geprüften Oedogonien, wurden gefärbte Plasmakörnchen vermißt.

Viel Neues haben unsere vergleichenden Versuche zur Kenntnis der Zellsaftfärbung beitragen können.

Fällung fester, rot oder schwarzrot gefärbter Körnchen in den Vakuolen ist kennzeichnend für die Fadengrünalge *Microspora floccosa* und die Mehrzahl der beobachteten *Tetrasporales* und *Protococcales*. Von letzteren zeigte die reichste Bildung solcher Körnchen unser *Coelastrum conglomeratum* (vgl. S. 145). In Mischproben ist der Gehalt an Körnchen bei verschiedenen Algenspezies oft quantitativ recht ungleich. Die Fällungskörnchen verschmelzen meist nicht. Die reagierenden Zellsaftstoffe können die Farbe so gierig an sich reißen, daß nichts davon für diffuse Vakuolenfärbung übrigbleibt (*Microspora*). — Mitunter kann ein Teil der Körnchen nachträglich aus dem Zellsaft ins Zytoplasma gelangen.

Die Bindung der Farbe erfolgt bekanntlich keineswegs immer nur an Tannine (vgl. Guilliermond-Atkinson, 1941),

wie das bei *Spirogyra* der Fall ist. Daß die Körnchenfällung sehr rasch geschehen kann, hat P. A. Dangeard (1916) für *Conferva bombycina* (*Tribonema bombycinum*) dargetan, wo schon ein Eintauchen der Fäden ins Farbbad für zwei Sekunden zur Fällung genügt (vgl. Pierre Dangeard 1947, S. 446)[2].

Die vitale Diffusfärbung von Zellsäften kommt im Gegensatz dazu nur viel langsamer zustande. Das haben wir an vielen Beispielen zeigen können. Solche diffuse Löslichkeitsspeicherung ist bei vielen Objekten die typische Form der Vitalfärbung. Für unsere Oedogonien ist sie die einzige Speicherform. Die Desmidiaceen zeigen entweder nur diffuse Zellsaftfärbung oder diese folgt der anfänglichen Körnchenfällung im Plasma in gewissem zeitlichem Abstand nach, hat aber dann an der schließlich erreichten Farbspeicherung meist einen weit größeren quantitativen Anteil. Bei *Gonatozygon* werden die dunkelroten Fällungskörperchen, die außerhalb der Vakuolenwandung liegen, recht groß; bei den meisten anderen Arten spielt die Plasmafällung gegenüber der Lösungsspeicherung nur eine untergeordnete Rolle.

Zur Frage, ob bei der diffusen Zellsaftfärbung der eingedrungene Farbstoff an zelleigene Vakuolenstoffe gebunden wird, läßt sich zunächst festhalten, daß es sich, wenn solche existierten, meist nicht, wie bei *Spirogyra*, um Tannine handeln könnte. Die vitale Gerbstoffreaktion mit Koffein, die bei *Spirogyra* stets zu Tröpfchenfällung führt, verläuft, wie bekannt und von uns bestätigt, bei den Desmidiaceen und den geprüften Chlorophyceen negativ. Daß Neutralrot und Cresylblau in tanninfreien Vakuolen gespeichert wird, haben unter anderen P. Dangeard, Scarth, Guilliermond bewiesen.

Hier bringt allerdings gegenüber dem, was in der französischen Literatur zur Frage diskutiert worden ist, die Vitalfärbung durch Farbionenspeicherung in „leeren", speicherstofffreien Zellen (Höfler, 1946, 1947) einen neuen Gesichtspunkt. Sollten nicht auch bei den Algen vielfach solche „leere" Zellsäfte vorliegen? Die ersten tastenden Fluorochromierungsversuche mit Akridinorange (S. 166) sprechen zugunsten dieser Annahme, die natürlich experimentell weiter zu prüfen bleibt.

Auch unsere in zytomorphologischer Hinsicht schönste Beobachtung steht damit in gutem Einklang. Wir meinen die Vakuolenkontraktion und -zerklüftung, die wir bei

Zur umfangreichen französischen Spezialliteratur über Algen-Vitalfärbung kann hier noch nicht Stellung genommen werden. Das soll in einer folgenden Mitteilung des zweitgenannten Verfassers geschehen.

den Desmidiaceen und bei Oedogonium in so markanter Weise vor sich gehen sahen. Sie wird in mehreren Abbildungen dieser Arbeit dargestellt.

Hier muß nun die Frage erörtert werden, ob nicht irgendwelche Eigentümlichkeiten unseres Versuchsmaterials der Disposition, nach Neutralrotbehandlung Vakuolenkontraktion eintreten zu lassen, zugrunde liegen. Es könnten ja z. B. die Tonoplasten, die Vakuolenhüllen an den alternden Zellen des winterlichen Materials schon an sich abnormal dick und stark sein. Hat doch Küster (1929 a, S. 135) mit Recht darauf hingewiesen, daß „deutlich sichtbare, derbe Vakuolenhüllen auch in alternden normalen Zellen gefunden werden", nicht nur nach experimentellen Schädigungen. Zellen aus Reservestoffbehältern (z. B. von der Zwiebelaußenepidermis) lassen derbe, vom Zytoplasma wohl differenzierte Tonoplasten leicht nachweisen (Küster 1929 b, Chambers und Höfler, 1931).

Hier lag nun einer der Gründe, mit der Veröffentlichung unserer Versuche vom Winter 1944/45, die damals abgebrochen werden mußten, noch zuzuwarten. Erst 1949 hat dann einer von uns (Höfler) Gelegenheit gehabt, in der Ramsau bei Schladming an sommerlich frischem, artenreichem Desmidiaceen-Material die Vitalfärbungsversuche mit Neutralrot zu wiederholen und sie auf Brillantcresylblau, Toluidinblau und einige andere basische Farbstoffe auszudehnen. Die neuen Beobachtungen haben unsere früheren voll bestätigt, so daß sich in der Vakuolenkontraktion mit Sicherheit die normale Reaktion der Zellen auf den Impuls der Vitalfärbung sehen läßt.

Im übrigen ist bekannt und wohl allgemein anerkannt, daß die Vakuolenwände sowohl bei Kappenplasmolyse wie bei Spontankontraktion sich viel schärfer vom Binnenplasma abheben als im intakten Zustand, da die Dicke der Tonoplasten und ihre Kapillarspannung, die zur Kugelrundung führt, gegenüber dem Normalzustand der Zelle wesentlich zugenommen hat (Höfler 1928, 1932, S. 466, 1939, S. 552, Weber 1930, S. 113, Strugger 1936, Cholnoky 1937, S. 959, 1949, Frey-Wyssling 1938, 1948, S. 125, 130); solche Veränderungen müssen indes nicht immer irreversibel sein.

Über spontane (d. h. nicht osmotisch bedingte) Kontraktion der Vakuolen besteht ein reiches Schrifttum. Seit Küsters (1926) und Webers (1930) grundlegenden Erstbeobachtungen ist das Phänomen immer mehr in den Vordergrund des zellphysiologischen Interesses getreten. Wenn von den Erscheinungen der Synärese abgesehen wird, so lassen sich mit Henner (1934) für

Gewebszellen der höheren Pflanzen zwei Haupttypen der Kontraktion unterscheiden: Die „schwache Kontraktion", die meist in allen Zellen eines Gewebes gleichmäßig auftritt, bei der sich die Vakuolen langsam verkleinern und lange am Leben bleiben — und die „starke Kontraktion", die in einzelnen, meist wundnahen Zellen auftritt, stärkere Grade erreicht und nachher oft bald zum Zellentod führt. Höfler (1948, S. 606) hat vorgeschlagen, besser von „Allgemeinkontraktion" und „Einzelkontraktion" zur Bezeichnung der beiden Typen zu sprechen.

Die Vakuolenkontraktion der vitalgefärbten Desmidiaceen erfolgt zwar oft allgemein, d. h. in allen artgleichen Zellen eines Materials. Trotzdem läßt sie sich den für Gewebszellen unterschiedenen Typen nicht einfach einreihen, sie stellt vielmehr ein zytologisches Phänomen dar, das in gewisser Hinsicht grundsätzlich neu erscheint und volles Interesse von seiten der Zellphysiologie beansprucht. Bei der typischen vitalen Allgemeinkontraktion quillt das Protoplasma auf und entzieht dadurch dem sich verkleinernden Zellsaft Wasser, der Raum zwischen dem Tonoplasten und der Zellwand ist zur Gänze vom gequollenen Plasma erfüllt, welchem, wie Weber (1930) an *Elodea* nachwies, auch die Fähigkeit zur aktiven Strömung erhalten bleiben kann. Gleiches gilt ja für den bekannten Aggregationsvorgang in Zellen der chemisch gereizten Tentakeln von *Drosera* (Åkerman 1917). Nur bei diesem Objekt erreicht wohl die Vakuolenzerschnürung und -verkleinerung, die mit der Kontraktion einhergeht, ähnliche Ausmaße wie bei unseren Desmidiaceen (vgl. z. B. Abb. 5—10, 14, 18). Bei den Algen ist aber, wenn die Kontraktion solche Grade erreicht hat, der Raum zwischen Tonoplasten und Zellwand wohl sicher nicht, wie bei *Drosera*, vom gequollenen Zytoplasma erfüllt! Sondern die mikroskopische Beobachtung spricht für die Annahme, daß die Vakuolenwände bei den Algen sich vom Plasmawandbelag lösen und daß farblose Flüssigkeit den Raum zwischen Tonoplasten und Wandplasma einnimmt. — Wenn auch hier die Tonoplasten, wie es für *Allium* und mehrere andere Objekte (Chambers und Höfler 1931, Lederer 1935) erwiesen ist, aus einer kohäsiven leicht beweglichen, mit H_2O nicht mischbaren, zum Hauptteil lipoiden Flüssigkeit bestehen, so läßt sich die Verkleinerung und Zerteilung aus den Gesetzen der Kapillarspannung mechanisch unmittelbar verstehen.

Was geschieht aber wohl beim Kontraktionsvorgang mit den gelösten Zellsaftstoffen? Die roten Farbkationen (bzw. die gefärbten Reaktionsprodukte des Neutralrots mit Zellstoffen) können den Tonoplasten nicht durchdringen, sondern werden, wie die

Beobachtung beweist, bei der Kontraktion fortschreitend eingeengt. Man muß also annehmen, daß der Raum außen, der farblose Flüssigkeit führt, abfiltrierten Zellsaft enthält; für gewisse von den osmotisch wirksamen Vakuolenstoffen müssen also die sich kontrahierenden Tonoplasten permeabel sein.

Möglicherweise hat sich innen am Plasmawandbelag (der z. B. bei *Tetmemorus* an der in ihm andauernden Plasmaströmung kenntlich ist) eine neue halbdurchlässige Grenzschicht gebildet. Sicher ist das Wandplasma, zumindest das Plasmalemma, für die durch den kontrahierten Tonoplasten gedrungenen Zellsaftstoffe noch undurchlässig. Denn wir sahen in Zuckerlösung gegebener Konzentration die Plasmolyse in kontrahierten Zellen ähnliche Grade erreichen wie in frischen, normalen Zellen; der osmotische Wert der Zellen kann sich also nicht wesentlich vermindert haben. Das unterscheidet die Desmidiaceen-Spontankontraktion von der von Henner bei *Ligustrum* beobachteten, wo der osmotische Wert durch Stoff-Exosmose auf einen Bruchteil des ursprünglichen sinkt, und nähert sie, zumindest was das Plasmalemma betrifft, der Allgemeinkontraktion bei *Elodea*, für welche Hartmaier (1938) eine im wesentlichen unverändert erhaltene Plasmapermeabilität nachgewiesen hat.

Wenn sich die hier entwickelten Vorstellungen bestätigen, so stellen die Vorgänge der Vakuolenkontraktion der Desmidiaceen und Chlorophyceen die Permeabilitätsforschung vor bedeutsame neue Fragen.

Recht wichtig erscheint schließlich auch die Beobachtung der Nichtfärbbarkeit der Heteroconte *Chlorobotrys regularis* (S. 160). Daß allein hier die Neutralrotbase unfähig wäre, durch das Plasma zu permeiern, erscheint sehr unwahrscheinlich. Dringt sie aber ein, so können erstens Stoffe, die das Neutralrot binden, in der Zelle nicht zugegen sein, d. h. der Zellsaft muß „leer" sein. Warum erfolgt dann aber allein hier keine zur Anfärbung führende Speicherung der Farbkationen? Eine Möglichkeit, die Nichtfärbung der Chlorobotrys-Zellsäfte zu verstehen, wäre gegeben, wenn man sich vorstellte, daß diese einen höheren p_H-Wert, eine mehr alkalische Reaktion hätten als die anderen Algenzellsäfte, bei welcher die eingedrungenen Farbmoleküle noch nicht zu Farbkationen dissoziieren und deshalb nicht über die außen im Farbbad vorhandene Konzentration hinaus angereichert werden können.

Literaturverzeichnis.

Åkerman, A., Untersuchungen über die Aggregation in den Tentakelzellen von *Drosera rotundifolia*. Bot. Notiser 1917, 145. 1917.

Barg, T., Methodisches zur Diatomeenuntersuchung. Protoplasma 36, 120. 1941.

Bethe, A., Der Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Permeabilität toter Membranen, auf die Adsorption an Eiweißsolen und auf den Stoffaustausch der Zellen. Biochem. Zeitschrift, 127, 18. 1922.

Brooks, S. C., und Moldenhauer-Brooks, M., The permeability of living cells. Protoplasma-Monographien, Vol. 19. Berlin 1941.

Chambers, R., und Höfler, K., Micrurgical studies on the tonoplast of Allium Cepa. Protoplasma 12, 338. 1931.

Cholnoky, B. von, Plasmolyse und Lebendfärbung bei Melosira. Protoplasma 22, 161. 1934.

— Protoplasmatische Untersuchungen durch Lebendfärbung und Plasmolyse. Math. u. naturwiss. Anzeiger d. ung. Akad. d. Wiss., Bd. 56, 944. 1937.

— Zytomorphologische Untersuchungen durch Lebendfärbung an *Primula malacoides*-Zellen. Bot. Notiser 1949, 163. 1949.

Dangeard, P. A., Nouvelles recherches sur le système vacuolaire. Bull. soc. Bot. Fr. 73. 1916.

Dangeard, Pierre, Cytologie végétale et cytologie générale. Paris 1947.

Drawert, H., Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. Ber. d. d. Bot. Ges. 56, 123. 1938.

— Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 34, 159. 1940.

— Desgl. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Zeitschr. f. Naturforschung, Bd. 3 b, 111. 1948.

— Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen II. Zeitschr. f. Naturforschung, Bd. 4 b, 35. 1949.

Eibl, K., Studien über das Plasmolyseverhalten der Desmidiaceen-Chromatophoren. Protoplasma 33, 531. 1939.

Frey-Wyssling, A., Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Protoplasma-Monographien, Bd. 15. Berlin 1938.

— Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivates. New York, Amsterdam 1948.

Gicklhorn, J., Elektive Vitalfärbungen. Probleme, Ziele, Ergebnisse, aktuelle Fragen und Bemerkungen zu den Methoden. Ergebnisse d. Biologie 7, 549. 1931.

Guilliermond, A., Mangenot, G., und Plantefol, L., Traité de cytologie végétale. Paris 1933.

Guilliermond, A., Atkinson, L. R., The cytoplasm of the plant cell. Waltham Mass., USA. 1941.

Hartmair, V., Über Vakuolenkontraktion in Pflanzenzellen. Protoplasma 28, 582. 1937.

Henner, J., Untersuchungen über Spontankontraktion der Vakuolen. Protoplasma 21, 81. 1934.

Hirn, K. E., Monographie der *Oedogoniaceae*. 1900.

Höfler, K., Über Kappenplasmolyse. Ber. d. d. Bot. Ges. 46, 73. 1928.

— Zur Tonoplastenfrage. Protoplasma 15, 462. 1932.

— Kappenplasmolyse und Ionenantagonismus. Protoplasma 33, 545. 1939.

Höfler, K., Sur la coloration vitale des vacuoles par l'orange d'acridine et le rouge neutre. Compt. rend. Ac. Sc. Paris 223, Nr. 7, 335. 1946.
— Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13. 1947.
— Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. Sitzungs-Ber. d. österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., I. Abt. 156, 585. 1948.
— Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Beitr. zur Fluoreszenzmikroskopie (1. Sonderband d. Zeitschr. Mikroskopie) 46. 1949.
Irwin, M., The penetration of dyes as influenced by hydrogen ion concentration. Journ. Gen. Physiol. 5, 727. 1923.
Klebs, G., Über die Organisation der Gallerte bei einigen Algen und Flagellaten. Unters. Bot. Inst. Tübingen 1, 333. 1885.
Kopetzky-Rechtperg, O. von, Über die Kristalle in den Zellen der Gattung Closterium Nitzsch *(Desmidiaceae)*. Beihefte Bot. Centralbl. 47, 1. Abt., 291. 1931.
— Mitteilung über eine Protoplasmastruktur des *Desmidiale Netrium digitus,* und über einige Zellinhaltskörper dieser Alge. Protoplasma 31, 607, 1938.
Krieger, W., Die Desmidiaceen Europas m. Ber. d. außereuropäischen Arten. Rabenhorst Krypt.-Flora, Bd. XIII, Abt. 1. 1933.
Küster, E., Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. Protoplasma 1, 73. 1926.
— Pathologie der Pflanzenzelle, I. Pathologie des Protoplasmas. Protoplasma-Monographien, Bd. 3. Berlin 1929 a.
— Beobachtungen an verwundeten Zellen. Protoplasma 7, 150. 1929 b.
— Die Pflanzenzelle. Jena 1935.
Lederer, B., Färbung, Fixierung und Mikrodissektion von Tonoplasten. Biologia generalis 11, 211. 1935 a.
— Färbungs-, Fixierungs- und mikrochirurgische Studien an Spirogyra-Tonoplasten. Protoplasma 22, 405. 1935 b.
Lütkemüller, J., Zur Kenntnis der Gattung Penium Breb. Verh. k. k. Zool.-Bot. Ges. Wien 55. 1905.
Moldenhauer-Brooks, M., Studies on the permeability of living cells. IX. Does methylene blue itself penetrate? University of California Publications in Zoology, Vol. 31, No. 6. 1927.
Pascher, A., Heterokontae. Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs u. d. Schweiz, Heft 11. 1925.
Pfeffer, W., Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Unters. Bot. Inst. Tübingen 2, 179. 1886.
Plass, H., Zur Pathologie der Diatomeenplastiden. Erscheinungen der natürlichen Degeneration. Protoplasma 36, 345. 1942.
Ruhland, W., Beiträge zur Permeabilität der Plasmahaut. Jahrb. f. wiss. Bot. 46, 1. 1908.
Scarth, G. W., The mechanism of accumulation of dyes by living cells. Plant. physiol. 1, 215. 1926.
Steinecke, Fr., Die Algen des Zehlaubruches in systematischer und biologischer Hinsicht. Schriften d. Physik.-ökon. Ges. zu Königsberg i. Pr. 56, 1. 1916.
Strugger, S., Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26, 56. 1936.
— Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss. 73, 97. 1940 a.

Strugger, S., Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 44, 601. 1940 b.
— Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. M. u. H. Schaper, Hannover 1949 a.
— Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949 b.
Weber, F., Vakuolenkontraktion vitalgefärbter *Elodea*-Zellen. Protoplasma 9, 106. 1930 a.
— Vakuolen-Kontraktion, Tropfenbildung und Aggregation in *Stomata*-Zellen. Protoplasma 9, 128. 1930 b.
— Vakuolenkontraktion und Vitalfärbung in Blütenzellen. Protoplasma 11, 312. 1930 c.
West, W., and G. S., A Monograph of the British Desmidiaceae, Vol. I—IV. London 1904—1912.
West, G. S., and Carter, N., Id. Vol. V. London 1923.